

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Inaktivierung des murinen Gens des
Hyperpolarisations-aktivierten Zyklonukleotid-
gesteuerten Kationenkanals Typ Drei (HCN3)**



von

Robert Mader

aus Ludwigsburg

2004

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Martin Biel betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 09.11.2004

Robert Mader

Dissertation eingereicht am 09.11.2004

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Biel

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Pfeifer

Mündliche Prüfung am 09.12.2004:

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	11
1.1	HCN-KANÄLE	11
1.1.1	<i>Eigenschaften des I_h-Stromes</i>	11
1.1.1.1	Aktivierung durch Hyperpolarisation	11
1.1.1.2	Modulation durch zyklische Nukleotide	12
1.1.1.3	Ionenselektivität und pharmakologische Inhibierung	13
1.1.2	<i>Struktur der HCN-Kanäle</i>	14
1.1.3	<i>Expressionsmuster der HCN-Kanäle</i>	16
1.1.4	<i>Funktionelle Eigenschaften von HCN-Kanälen</i>	17
1.1.5	<i>HCN-Knockout-Modelle</i>	18
1.2	ZIELSTELLUNG	19
2.	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	DNS-METHODEN	21
2.1.1	<i>Amplifikation und Isolierung von Plasmiden</i>	21
2.1.1.1	Verwendete Plasmide	21
2.1.1.2	Kultivierung von E.coli	22
2.1.1.3	Transformation von E.coli	22
2.1.1.4	Alkalische Lyse - Schnelltest (Miniprep)	23
2.1.1.5	Alkalische Lyse (Maxiprep)	23
2.1.2	<i>Isolation von genomischer DNS</i>	23
2.1.2.1	Genomische DNS für die Genotypisierung	23
2.1.2.2	Genomische DNS für Southern Blots	24
2.1.3	<i>Reinigung von DNS</i>	24
2.1.3.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	24
2.1.3.2	Fällen von DNS	24
2.1.3.3	Elektroelution	24
2.1.3.4	Verwendung des GFX-Kits zur Reinigung von DNS	25
2.1.4	<i>Enzymatische Modifikation von DNS</i>	25
2.1.4.1	Restriktionsverdau	25
2.1.4.2	Phosphorylierung von Linkern	25
2.1.4.3	Dephosphorylierung von DNS	25
2.1.4.4	Ligation von linearisierten DNS-Fragmenten	26
2.1.5	<i>Elektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten</i>	26
2.1.5.1	Agarosegele	26
2.1.5.2	PAGE-Gele	27
2.1.6	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>	27
2.1.6.1	Fehlerkorrigierende PCR	28
2.1.6.2	Genotypisierung	28
2.1.6.3	Long Template- (LT-) PCR	29
2.1.7	<i>Sequenzierung</i>	30
2.1.8	<i>Southern Blot</i>	31
2.1.8.1	Gele	32
2.1.8.2	Membrantransfer	32
2.1.8.3	Herstellung radioaktiv markierter Sonden	33
2.1.8.4	Hybridisierung	33
2.1.8.5	Rehybridisierung	33
2.2	RNS-METHODEN	34
2.2.1	<i>Isolation von Gesamt-RNS aus Gewebe</i>	34
2.2.2	<i>Reverse Transkription</i>	34
2.3	PROTEIN-METHODEN	35
2.3.1	<i>Membranpräparation von Proteinen aus HEK293-Zellen</i>	35
2.3.2	<i>Protein Isolation aus Gewebe</i>	35
2.3.3	<i>Quantifizierung von Proteinen</i>	36
2.3.4	<i>Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen auf SDS-PAGE-Gelen</i>	36

2.3.5	<i>Western Blot</i>	38
2.4	HERSTELLUNG EINES POLYKLONALEN ANTI-HCN3-ANTIKÖRPERS.....	38
2.4.1	<i>Präparative Proteinexpression</i>	38
2.4.2	<i>Aufreinigung und Konzentration des Antigens</i>	39
2.4.3	<i>Immunisierung von Kaninchen</i>	40
2.4.4	<i>Aufreinigung des Antikörpers</i>	41
2.4.5	<i>Test der Antisera und der Antikörper</i>	41
2.5	HISTOCHEMIE.....	41
2.5.1	<i>Gewebeisolierung</i>	41
2.5.2	<i>Herstellung von Gewebeschnitten</i>	42
2.5.2.1	Kryoschnitte.....	42
2.5.2.2	Paraffinschnitte.....	43
2.5.3	<i>Detektion</i>	44
2.5.3.1	Nachweis über Immunfluoreszenz.....	44
2.5.3.2	Nachweis mit DAB-Färbung.....	44
2.5.3.3	XGal-Färbung.....	45
2.5.4	<i>Licht- und Fluoreszenzmikroskopie</i>	45
2.5.5	<i>Konfokale Laser Mikroskopie</i>	45
2.6	KULTUR EUKARYONTISCHER ZELLEN.....	45
2.6.1	<i>Medien</i>	46
2.6.2	<i>Kultivieren von HEK-Zellen</i>	46
2.6.3	<i>Stabile Transfektion von HEK-Zellen</i>	46
2.6.4	<i>Selektion und Isolation stabil transfizierter Zellen</i>	47
2.7	GENETISCHE MODIFIKATION VON TIEREN.....	47
2.8	STAMMZELLKULTUR UND ES ZELL TARGETING.....	49
2.8.1	<i>Herkunft der Stammzellen</i>	49
2.8.2	<i>Material, Nährmedien und Lösungen</i>	50
2.8.3	<i>Feederzellen</i>	51
2.8.3.1	Gewinnung embryonaler Fibroblasten.....	51
2.8.3.2	Kultivierung und Passagierung der Feederzellen.....	52
2.8.3.3	Bestrahlung.....	52
2.8.3.4	Gefrierstocks.....	52
2.8.3.5	Auftauen der Feederzellen.....	52
2.8.4	<i>Erstes ES Zell Targeting</i>	53
2.8.4.1	Auftauen von Stammzellen.....	53
2.8.4.2	Splitten von Stammzellen.....	53
2.8.4.3	Linearisierung des Targeting Vektors zur Elektroporation.....	53
2.8.4.4	Elektroporation von Stammzellen.....	53
2.8.4.5	Selektion rekombinierter Stammzellen.....	54
2.8.4.6	Isolation resistenter Klone.....	54
2.8.4.7	Gefrierstocks.....	54
2.8.4.8	Analyse der resistenten Klone.....	54
2.8.5	<i>Zweites ES Zell Targeting</i>	55
2.8.5.1	Auftauen und Kultivieren positiver Klone.....	55
2.8.5.2	Transiente Transfektion der ES Zellen mit Cre-Plasmid.....	55
2.8.5.3	Negative Selektion von rekombinierten Stammzellen.....	55
2.8.5.4	Isolation, Gefrierstocks und Analyse der rekombinierten Klone.....	55
2.9	ERZEUGUNG GENETISCH MODIFIZIERTER MÄUSE.....	55
2.9.1	<i>Verwendete Tiere</i>	55
2.9.2	<i>Vorbereitung der ausgewählten Klone</i>	56
2.9.3	<i>Gewinnung von Blastozysten</i>	56
2.9.4	<i>Erzeugung pseudoschwangerer Leihmütter</i>	56
2.9.5	<i>Injektion der Stammzellen in die Blastozysten</i>	56
2.9.6	<i>Reimplantation der Blastozysten</i>	56
2.9.7	<i>Verpaarung der Chimären</i>	57
2.9.8	<i>Mauszucht</i>	57
2.10	VERHALTENSVERSUCHE.....	57
2.10.1	<i>Morris Water maze</i>	57
2.10.2	<i>Open Field Test</i>	58
2.10.3	<i>Dark-Light-Transition Test</i>	59

2.10.4	<i>Rotarod</i>	60
2.10.5	<i>Geruchsaversionstest</i>	60
2.11	KARDIOLOGISCHE EXPERIMENTE	61
2.11.1	<i>EKG</i>	61
2.11.2	<i>Isoliertes Sinusknoten-Vorhof Präparat</i>	61
3.	ERGEBNISSE	63
3.1	KONSTRUKTION DES VEKTORS ZUR HOMOLOGEN REKOMBINATION.....	63
3.1.1	<i>Restriktionskarte und Sequenzierung des HCN3 Lokus</i>	63
3.1.2	<i>Konstruktion des Targeting Vektors</i>	64
3.1.3	<i>Erstellung der Gensonden zum Nachweis der Rekombination des Genoms</i>	64
3.2	HERSTELLUNG EINES POLYKLONALEN ANTI-HCN3-ANTIKÖRPERS	65
3.2.1	<i>Antigen</i>	65
3.2.1.1	Klonierung der Konstrukte	65
3.2.1.2	Expression der Konstrukte und präparative Aufreinigung.....	66
3.2.2	<i>Antikörper</i>	67
3.2.2.1	Test der erhaltenen Antisera	67
3.2.2.2	Test der Antikörper	68
3.3	ES-ZELL TARGETING	70
3.3.1	<i>Erstes Targeting</i>	70
3.3.1.1	Southern Blots zum Nachweis der Rekombination	70
3.3.1.2	Analyse mit der 5'-Sonde (Sonde V).....	71
3.3.1.3	Kontrolle der ersten loxP-Sequenz	72
3.3.1.4	Analyse mit der 3'-Sonde (Sonde H).....	72
3.3.1.5	Analyse mit der neo-Sonde (Sonde N)	72
3.3.1.6	Sequenzierung	73
3.3.2	<i>Zweites Targeting</i>	73
3.3.2.1	Southern Blots zum Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination	74
3.3.2.2	Hybridisierung mit der 3'-Sonde	74
3.3.2.3	Hybridisierung mit der neo-Sonde.....	74
3.3.2.4	Hybridisierung mit der Sonde 2.....	75
3.3.2.5	PCR	76
3.4	ERZEUGUNG DER MAUSLINIEN UND AUFZUCHT	77
3.4.1	<i>Injektion positiver ES-Zellklone</i>	77
3.4.2	<i>Nachweis der Mutationen in den Mauslinien</i>	79
3.4.2.1	Southern Blot.....	79
3.4.2.2	RT-PCR.....	79
3.4.2.3	Western Blot.....	80
3.4.3	<i>In vivo Rekombination der HCN3/lacZ Mauslinie</i>	80
3.4.4	<i>PCR zur routinemäßigen Genotypisierung</i>	81
3.5	LOKALISATION DES HCN3 KANALS	82
3.5.1	<i>Western Blot</i>	82
3.5.2	<i>Histochemie</i>	83
3.6	VERHALTENSVERSUCHE	86
3.6.1	<i>Morris Water maze</i>	87
3.6.2	<i>Open Field Test</i>	89
3.6.3	<i>Dark-Light-Transition Test</i>	91
3.6.4	<i>Rotarod</i>	92
3.6.5	<i>Geruchsaversionstest</i>	92
3.7	ANALYSE DER HERZFUNKTION	93
3.7.1	<i>EKG</i>	93
3.7.1.1	Aktivität und Herzfrequenz	94
3.7.1.2	Repolarisation der Herzkammer	96
3.7.1.3	Pharmakologie.....	97
3.7.2	<i>Isolierte Sinusknoten-Vorhof-Präparate</i>	98
4.	DISKUSSION	101
4.1	VEKTORKONSTRUKTION, TARGETING UND ERZEUGUNG DER MAUSLINIEN	101
4.2	LOKALISATION VON HCN3.....	102
4.3	VERHALTENSVERSUCHE	104

4.4	KARDIOLOGISCHE EXPERIMENTE	105
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	107
6.	ANHANG	109
6.1	VERWENDETE PRIMER.....	109
6.2	ANTIKÖRPER.....	110
6.2.1	<i>Primäre Antikörper</i>	<i>110</i>
6.2.2	<i>Sekundäre Antikörper</i>	<i>110</i>
7.	LITERATURVERZEICHNIS	111
8.	LEBENS LAUF	117
9.	DANKSAGUNG	118

Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
HCN3/ β Gal	Allel mit aktivem β -Galactosidasereporter gen, nach Deletion der Selektionskassette
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin, bovine serum albumin
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CNBD	Zyklonukleotid-Bindungsdomäne
cpm	Zähler pro Minute, counts per minute
CS	Konditionierter Stimulus
d	Tag
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dpm	Desintegrations per minute
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
ddNTP	2',3'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP)
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EOG	Elektroolfaktogramm
ERG	Elektroretinogramm
flox	gefloxtes Allel
h	Stunde(n) / human
HRP	Meerrettichperoxidase, horseradish peroxidase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen, Einheit, 1000 Basenpaare
KI	Knock-in
KG	Körpergewicht
KO	Knock-out
HCN3/ lacZ	inaktives β -Galactosidasereporter gen (enthält die gefloxtete Selektionskassette)
LB	Luria-Bertani
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
loxP	Erkennungssequenz der CRE-Rekombinase, locus of crossover (x) of Phage P
LSCM	Laser-Konfokalmikroskop, Laser scanning confocal microscope
m	Minuten / von der Maus stammend
MCS	Multiple Klonierungsstelle, multiple cloning site
Mo	Monat
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat

Neo	Neomycinresistenz-Gen
NGS	Normales Ziegenserum, normal goat serum
NS	Neutraler Stimulus
n.s.	nicht signifikant
nt	Nukleotid(e)
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gel
PB	NaCl-freie Phosphat-gepufferte Lösung
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCE	Phenol-Chloroform-Extraktion
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNS	Ribonukleinsäure
RPM	Umdrehungen pro Minute, rounds per minute
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-Borat-NaCl-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
U	Unit, Einheit
US	Unkonditionierter Stimulus
UV	Ultraviolett
Wo	Woche
WT	Wildtyp
XGal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid

1. Einleitung

1.1 HCN-Kanäle

1.1.1 Eigenschaften des I_h -Stromes

Eine ganze Reihe physiologischer Prozesse weisen rhythmische Abläufe auf. Dazu gehören zum Beispiel der Herzschlag, der Schlaf-Wachrhythmus und die Atemfrequenz, aber auch die Hormonsekretion. Diese Vorgänge erfordern spezielle biologische Schrittmacher. Sie müssen einerseits den Rhythmus möglichst konstant aufrechterhalten, andererseits aber gleichzeitig in der Lage sein, auf äußere Veränderungen mit einer Frequenzanpassung zu reagieren.

In den späten siebziger Jahren wurden Ströme entdeckt, welche die für biologische Schrittmacher geforderten Eigenschaften aufweisen. Sie werden durch Hyperpolarisation aktiviert, fließen einwärts und können durch Adrenalin (bzw. den nachgeschalteten second messenger cAMP) reguliert werden (Brown, DiFrancesco et al. 1979; Noma, Yanagihara et al. 1977). Die ungewöhnliche Eigenschaft, bei Potentialen unter -60 mV in der Nähe des Ruhemembranpotentials zu aktivieren, trug dem Strom zunächst die Bezeichnung I_f (f für funny, im Herzen) bzw. I_q (q für quer, in Neuronen) ein. Später wurde er schließlich als I_h (h für hyperpolarization-activated) bezeichnet.

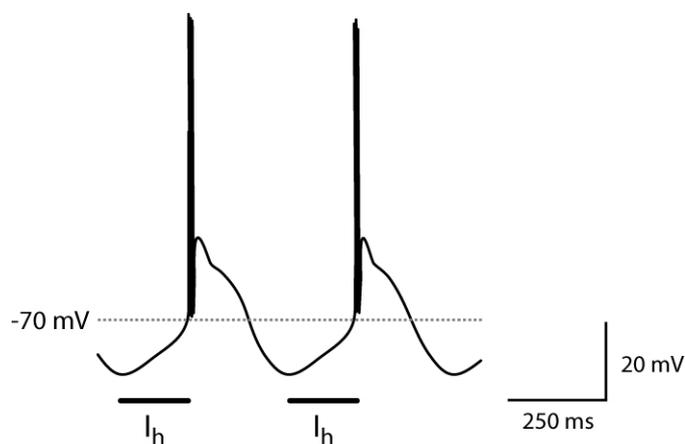


Abbildung 1-1 Aktionspotentiale von thalamischen Schrittmacherneuronen

Das negative Membranpotential der Nervenzelle wird durch I_h bis zur Schwelle eines erneuten Aktionspotentials angehoben. Abb. modifiziert nach Pape (1996)

1.1.1.1 Aktivierung durch Hyperpolarisation

I_h ist ein Kationenstrom, der durch einen Potentialabfall auf unterhalb von -50 bis -60 mV aktiviert wird (Abbildung 1-1). Das benötigte Potential variiert je nach Zelltyp (DiFrancesco und Mangoni 1994). Auch die Kinetik weist bei unterschiedlichen Zellen eine große Variabilität auf. Während der Zeitverlauf der Aktivierung im Herzen sehr langsam ist (bis zu

mehreren Sekunden), findet man in Photorezeptoren oder CA1 Neuronen aus dem Hippocampus sehr schnelle Ströme, die innerhalb von nur 30 bis 60 ms aktivieren.

Die Spannungsabhängigkeit von I_h lässt sich mit Hilfe der Boltzmann Funktion beschreiben. In diesem Fall gibt sie die Größe des Stroms in Abhängigkeit vom Grad der Hyperpolarisation an. Eine elektrophysiologische Kenngröße ist $V_{1/2}$, die Spannung, bei der der Strom halbmaximal ist. Die erhaltenen Werte variieren in verschiedenen Geweben meist zwischen -60 und -90 mV, können aber in der Herzkammer bis zu -120 mV betragen.

1.1.1.2 Modulation durch zyklische Nukleotide

Der second messenger cAMP ist ein wichtiger Regulator des I_h . Neurotransmitter, die den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen, erleichtern die Aktivierung des I_h -Stroms, indem sie die Spannungsabhängigkeit zu positiveren Potentialen verschieben. Dies resultiert in einer schnelleren und vollständigeren Aktivierung von I_h .

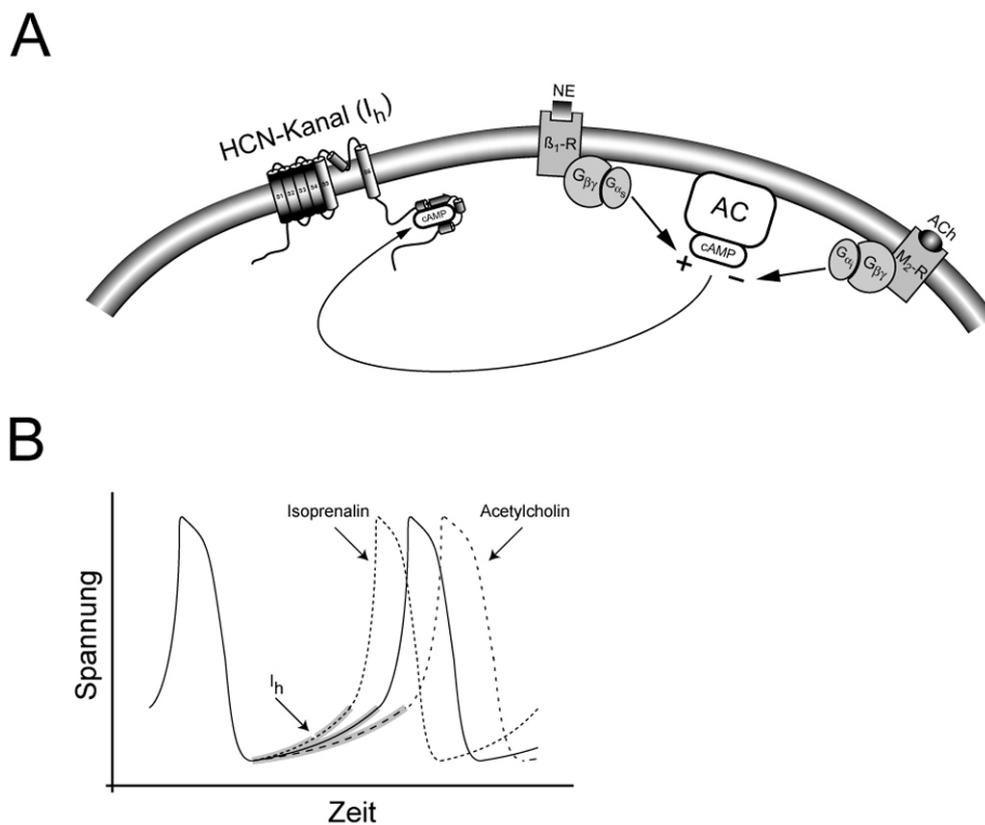


Abbildung 1-2 Modulation des I_h und der Herzfrequenz

(A) Schematische Darstellung der Regulation des I_h im Herzen durch Noradrenalin (NE) bzw. Acetylcholin (ACh). β_1 -adrenerge (β_1 -R) bzw. muskarinische Acetylcholinrezeptoren (M_2 -R), G_{α_s} stimulierendes G-Protein, G_{α_i} inhibierendes G-Protein, Adenylatzyklase (AC), zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) (B) Veränderung der Frequenz der Aktionspotentiale durch β -adrenerge Stimulation (Isoprenalin) bzw. durch Hemmung mit Acetylcholin.

Im Herzen bewirken zyklische Nukleotide eine Steigerung der Herzfrequenz als Antwort auf β -adrenerge Agonisten (Abbildung 1-2). Über β_1 -Adrenorezeptoren und die Adenylatzyklase steigt der intrazelluläre cAMP-Spiegel. Die schnellere und stärkere Aktivierung von I_h führt

zu einer schnelleren Depolarisation in Richtung des Schwellenpotentials; das nächste Aktionspotential wird früher ausgelöst. Dies erklärt den positiv chronotropen Effekt von β -Sympathomimetika.

Umgekehrt wird durch Neurotransmitter und Pharmaka, die den intrazellulären cAMP-Spiegel verringern, die Aktivierbarkeit von I_h reduziert, indem die Spannungsabhängigkeit hin zu negativeren Potentialen verschoben wird.

Im Herzen wird die Aktivität der Adenylatzyklase durch Acetylcholin über muskarinische Rezeptoren reduziert und der zytoplasmatische cAMP-Spiegel gesenkt. Die diastolische Depolarisation verläuft durch die geringere Aktivierung von I_h flacher und das nächste Schwellenpotential wird später erreicht.

Im Thalamus ist eine entsprechende Regulation für den Schlaf-Wach-Rhythmus durch Noradrenalin bzw. Acetylcholin beschrieben (McCormick und Bal 1997).

Die Modulation durch cAMP geschieht direkt und wird nicht über Proteinphosphorylierung durch cAMP-abhängige Kinasen vermittelt (DiFrancesco und Tortora 1991). Die Bindungsstelle liegt auf der intrazellulären Seite des Kanals. Auch cGMP hat diesen Effekt, jedoch ist die Affinität um den Faktor zehn niedriger als bei cAMP. Es gibt Anhaltspunkte für eine zusätzliche Modulation des I_h -Stromes durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung, bisher konnte dies aber noch nicht eindeutig belegt werden (Yu, Chang et al. 1993; DiFrancesco, Ferroni et al. 1986).

1.1.1.3 Ionenselektivität und pharmakologische Inhibierung

I_h -Kanäle sind permeabel für Kalium- und Natriumionen. Die Leitfähigkeit für Kalium ist um den Faktor 3-5 höher als für Natrium (Pape 1996). Hieraus ergibt sich ein Umkehrpotential von etwa -20 mV. Aufgrund der ionischen Verhältnisse an der Zellmembran führt dies bei einem negativeren Membranpotential zu einem Einwärtsstrom, der von Natriumionen getragen wird. Ist das Membranpotential dagegen positiver als -20 mV, so wäre theoretisch ein Nettoauswärtsstrom von Kaliumionen zu erwarten. Allerdings ist der I_h -Strom, wie bereits erwähnt, nur bei deutlich negativeren Potentialen als -20 mV aktivierbar.

I_h -Kanäle werden ebenso wie einige Kaliumkanäle („inward rectifier“ K^+ -Kanäle) durch relativ geringe Konzentrationen von Caesiumionen (1-2 mM) blockiert. Im Gegensatz zu diesen ist I_h jedoch insensitive gegenüber Bariumionen, die andere Kaliumkanäle effektiv blockieren.

Inzwischen gibt es eine Klasse spezifischer I_h -Blocker. Aufgrund ihrer Eigenschaft, bradykard zu wirken, werden sie „Bradine“ genannt (Zatebradin, Cilobradin, Ivabradin). Ein Wirkstoff dieser Klasse, Ivabradin (Bois, Bescond et al. 1996), wird demnächst mit der Indikation Angina pectoris in den Handel kommen. Ivabradin soll durch Senkung der Herzfrequenz den kardialen Sauerstoffverbrauch reduzieren.

1.1.2 Struktur der HCN-Kanäle

Ende der neunziger Jahre konnte die Struktur der I_h -Kanäle aufgeklärt werden (Ludwig, Zong et al. 1998; Santoro, Grant et al. 1997; Gauss, Seifert et al. 1998). Die Kanäle wurden mit HCN (**h**yperpolarization-activated, **c**yclic **n**ucleotide-gated) bezeichnet. Bei Säugetieren wurden insgesamt vier Isoformen (HCN 1-4) gefunden. Ein verwandtes Gen wurde in einer cDNS-Bibliothek aus Seeigelsperma (spHCN, Gauss, Seifert et al. 1998) und ein weiteres in einer Motte (hvHCN, Krieger, Strobel et al. 1999) gefunden.

Die HCN-Kanäle besitzen sechs Transmembransegmente (S1-S6) mit einem positiv geladenen Spannungssensor im vierten Segment (S4) und der Porenregion zwischen den Segmenten S5 und S6 (Abbildung 1-3). Am intrazellulären C-Terminus befindet sich eine Zyklonukleotidbindungstasche (CNBD). Während die Kanalisoformen im Transmembranbereich und in der Zyklonukleotidbindungstasche eine hohe Homologie besitzen (80-90 %), variieren die intrazellulären N- und C-Termini sehr stark.

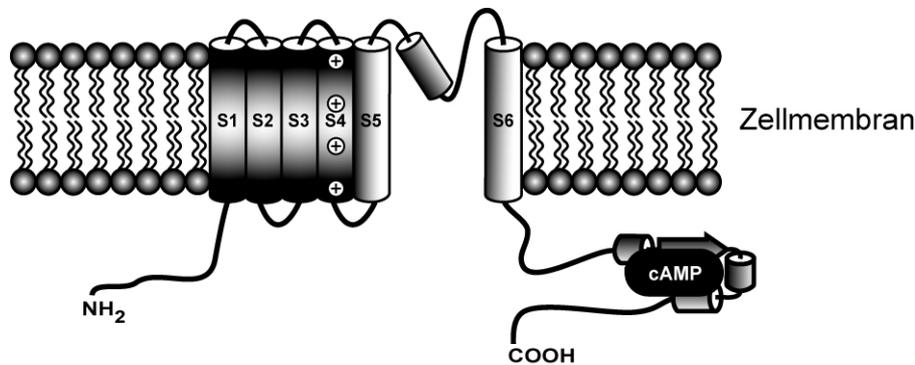


Abbildung 1-3 Schematische Darstellung der Struktur der HCN-Kanäle

HCN-Kanäle besitzen 6 Transmembransegmente. Der Spannungssensor liegt im vierten Segment, die Porenregion zwischen dem fünften und sechsten. Am C-terminalen Ende befindet sich die Zyklonukleotidbindungstasche (CNBD).

Über die HCN-Kanäle hinaus zeigt sich eine Homologie zu Kalium- und zyklonukleotidgesteuerten Kanälen (Abbildung 1-4). Der Spannungssensor ist bei vielen spannungsabhängigen Kanälen konserviert; die CNBD zeigt eine Homologie zu verschiedenen zyklonukleotidbindenden Proteinen.

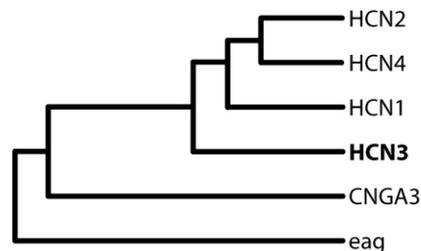


Abbildung 1-4 Phylogenetischer Stammbaum

HCN-Kanäle haben eine Verwandtschaft zu zyklonukleotidgesteuerten Kanälen (CNG) und Kaliumkanälen (eag: muriner Kaliumkanal). HCN3 hat zu den anderen HCN-Isoformen die geringste Homologie, während HCN2 und 4 eine besonders große Homologie aufweisen.

Die Pore

Die Porenregion liegt zwischen dem fünften und dem sechsten Segment. Hier befindet sich eine hochkonservierte Aminosäuresequenz mit dem GYG-Motiv, das den Selektivitätsfilter der Kaliumkanäle darstellt. Bei den HCN-Kanälen ist die Selektivität allerdings vermindert; wie oben beschrieben, leiten sie auch Natrium. Dies ist für die Funktion als Schrittmacher nötig, da die Kanäle hierfür bei hyperpolarisierten Potentialen in der Lage sein müssen, Ströme zu leiten. Bei Potentialen negativer als -20 mV ist dies aufgrund der Ionenverteilung praktisch nur durch Natriumionen möglich.

Der Spannungssensor

Die positive Ladung des S4-Segments führt dazu, dass es sich je nach Polarität der Membran in Richtung des Zelläußeren (bei Depolarisation) bzw. zum Zytosol (bei Hyperpolarisation) hin bewegt. Während bei depolarisationsaktivierten Kanälen eine Hyperpolarisation, also eine Einwärtsbewegung des S4-Segments, die Kanäle schließt, öffnen sich bei der gleichen Bewegung die HCN-Kanäle. Es konnte gezeigt werden, dass es sich tatsächlich um den gleichen Mechanismus handelt (Männikkö, Elinder et al. 2002), der dann aber einem unterschiedlichen Effekt bewirkt (Kanalöffnung oder -inaktivierung). Der genaue Mechanismus der Reaktion des Spannungssensors auf eine Spannungsänderung und die dadurch erfolgende Steuerung der Kanalöffnung sind noch nicht geklärt.

Die Zyklonukleotidbindungstasche

Besser untersucht ist die Bindungstasche für zyklische Nukleotide am intrazellulären C-Terminus. Sie ist homolog zu ähnlichen Regionen in anderen zyklonukleotidbindenden Proteinen, wie den zyklonukleotidaktivierten Kationenkanälen (CNG-Kanäle) oder cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen. Bei den HCN-Kanälen ist die CNBD eine autoinhibitorische Domäne. Sie interagiert in Abwesenheit von cAMP mit der Porenregion des HCN-Kanals und erschwert die spannungsabhängige Öffnung. Ein erhöhter cAMP-Spiegel hebt diese Inhibierung auf. In Versuchen mit Kanalmutanten konnte gezeigt werden, dass die Deletion der CNBD den gleichen Effekt auf den I_h -Strom hat wie die Verwendung sättigender Konzentrationen von cAMP (Wainger, DeGennaro et al. 2001).

Die Struktur der CNBD und der Verbindung zu den Transmembransegmenten (C-Linker) von HCN2 konnte mittlerweile kristallisiert werden Abbildung 1-5 Kristallstruktur der CNBD von HCN-Kanälen (Abbildung 1-5, Zagotta, Olivier et al. 2003). Aus der Struktur konnte ein möglicher Mechanismus für die Interaktion der CNBD mit der Porenregion abgeleitet werden.

HCN-Kanäle bestehen aus Tetrameren

Die Kristallstruktur der Nukleotidbindungstasche gibt zusätzlich einen Hinweis auf die Kanalstöchiometrie. Sie zeigt vier zusammengelagerte Monomere. Dies bestätigt zuvor aufgestellte Modelle, nach denen sich die HCN-Kanäle, wie andere Kaliumkanäle auch, zu Tetrameren zusammenlagern (Xue, Marban et al. 2002). Einen weiteren Hinweis darauf gibt die Kristallstruktur eines Kaliumkanals (KvAP) aus einem Archaeobakterium (Jiang, Lee et al. 2003). Dass diese Struktur ebenfalls für HCN-Kanäle angenommen werden kann, wird

aufgrund der Homologie (Porenregion, Spannungssensor, Transmembransegmente) vermutet. Zudem gibt es mehrere Hinweise, dass sich Heterotetramere aus verschiedenen HCN-Isoformen bilden können (Much, Wahl-Schott et al. 2003; Chen, Wang et al. 2001; Xue, Marban et al. 2002; Ulens und Tytgat 2001). Ein weiterer Anhaltspunkt ist die mittlerweile belegte Heterotetramerisierung der verwandten CNG-Kanäle (Biel, Zong et al. 1999).

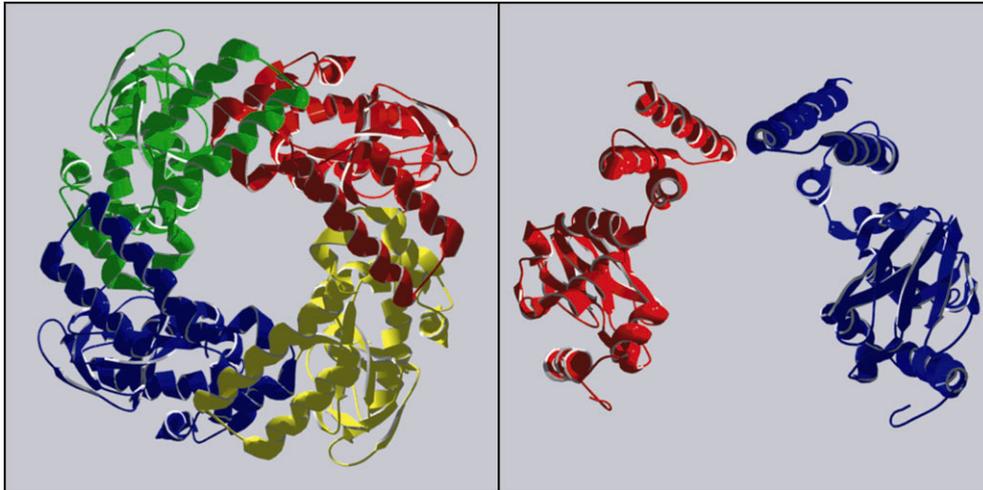


Abbildung 1-5 Kristallstruktur der CNBD von HCN-Kanälen

Links: Aufsicht (von der Membran aus) auf die intrazelluläre Zyklonukleotidbindungstasche. Die Kristallisation erfolgte in Anwesenheit von cAMP. Die vier Untereinheiten des Tetramers sind in verschiedenen Farben dargestellt. Rechts: seitliche Sicht auf zwei der vier Untereinheiten. Die α -Helices im oberen Bereich stellen den Linker zu den Transmembransegmenten, die weiter unten liegenden Teile die eigentliche Bindungstasche dar. (Zagotta, Olivier et al. 2003)

Ströme klonierter HCN-Kanäle

In heterologen Systemen exprimieren alle vier Isoformen Ströme, die die Eigenschaften von I_h aufweisen. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Aktivierungskinetik und der Modulierbarkeit durch cAMP. Zusätzlich sind auch Unterschiede in der Affinität der Bradine zu den einzelnen Isoformen festgestellt worden (Stieber, Hofmann et al. 2004).

Während HCN1, 2 und 4 elektrophysiologisch sehr gut charakterisiert worden sind, ist dies bisher für HCN3 nicht der Fall. Bekannt ist, dass HCN3 bezüglich der Aktivierungskinetik zwischen HCN2 und HCN4 eingeordnet werden kann. HCN1 ist der am schnellsten, HCN4 der am langsamsten aktivierende Kanal. Weitere Merkmale, wie die Modulation durch cAMP oder die Blockierbarkeit durch Bradine sind bei HCN3 bisher noch nicht endgültig bestimmt worden.

1.1.3 Expressionsmuster der HCN-Kanäle

Herz

Im Herzen konnten HCN1, 2 und 4 nachgewiesen werden (Ludwig, Zong et al. 1998; Ludwig, Zong, Hofmann et al. 1999; Ludwig, Zong, Stieber et al. 1999; Moosmang, Stieber et al.

2001). Erst kürzlich konnten auch Transkripte von HCN3 im Herzen (Stieber, Herrmann et al. 2003), sowie in einer Herzmuskelzelllinie (Sartiani, Bochet et al. 2002) nachgewiesen werden, allerdings nur in sehr geringen Mengen.

Gehirn

Im Gehirn kommen ebenfalls alle vier HCN-Kanäle vor (Moosmang, Biel et al. 1999; Moosmang, Stieber et al. 2001; Notomi und Shigemoto 2004; Santoro, Chen et al. 2000). Das Expressionsmuster unterscheidet sich von Isoform zu Isoform. HCN3 wird hauptsächlich im olfaktorischen Bulbus exprimiert, aber auch im Bereich des Hypothalamus. Insgesamt zeigt HCN3 die schwächste Expression, allerdings gibt es auch hier wesentlich weniger Daten als zu den anderen Isoformen.

Weitere Gewebe

HCN-Kanäle wurden weiterhin in der Retina (Müller, Scholten et al. 2003) und in dorsalen Wurzelganglien (Moosmang, Stieber et al. 2001; Chaplan, Guo et al. 2003) beschrieben. In weiteren sensorischen Organen (olfaktorisches Epithel, Zunge) wurden sie ebenfalls nachgewiesen.

1.1.4 Funktionelle Eigenschaften von HCN-Kanälen

Physiologische Funktion von HCN-Kanälen

Neben der bereits beschriebenen Rolle als Schrittmacherkanäle im Herzen werden HCN-Kanäle noch mit weiteren physiologischen Funktionen in Verbindung gebracht.

In sensorischen Neuronen, insbesondere den Photorezeptoren, spielt I_h eine Rolle bei der Einstellung des Ruhemembranpotentials (Fain, Quandt et al. 1978). Bei hellem Licht und der dadurch ausgelösten starken Hyperpolarisation der Photorezeptoren reduziert die Aktivierung von I_h das Ausmaß der Hyperpolarisation. Es wird angenommen, dass dies einen adaptiven Mechanismus darstellt (Bader, Macleish et al. 1979). Für die Wirkstoffklasse der Bradine wurde inzwischen in klinischen Studien als Nebenwirkung die Erzeugung heller Lichtblitze beschrieben, was diese Interpretation stützen würde.

In Dendriten von hippocampalen CA1-Neuronen wurde ein I_h beschrieben, der mit zunehmender Entfernung vom Soma immer stärker wird (Magee 1998). I_h soll eine Modulation des zeitlichen Verlaufs eines exzitatorischen postsynaptischen Potentials (EPSP) bewirken. Ein erhöhter I_h führt zu einer verlangsamten Weiterleitung der EPSPs und kann auf diese Weise die zeitliche Summation erhöhen (Magee 1999).

Eine weitere Funktion der HCN-Kanäle wurde in thalamokortikalen Neuronen entdeckt (Abbildung 1-1). Ohne synaptische Erregungen feuern sie in einer Frequenz von 0,5-4 Hz. Auch hier ist ein langsamer depolarisierender Strom zu beobachten (McCormick und Pape 1990). Die Modulation der HCN-Kanäle durch cAMP ist an der Steuerung des Schlaf-Wach-Rhythmus beteiligt (McCormick und Bal 1997).

Weiterhin wurden HCN-Kanäle im nozizeptiven System beschrieben (Chaplan, Guo et al. 2003). Ihre Funktion ist hier jedoch unklar.

Pathophysiologie

Trotz der vielseitigen Funktionen und ubiquitären Expression in neuronalem und kardialem Gewebe gibt es überraschend wenige Berichte über eine Beteiligung von HCN-Kanälen an pathophysiologischen Vorgängen, sowohl für angeborene als auch für erworbene Krankheiten.

Kürzlich wurden zwei unterschiedliche Mutationen von HCN4 beschrieben (Ueda, Nakamura et al. 2004; Schulze-Bahr, Neu et al. 2003). Im ersten Bericht führt die Mutation einer Aminosäure (D553N) zu schwerwiegender Bradykardie und polymorphen ventrikulären Extrasystolen (torsades des pointes). Im zweiten Fall verursacht die Deletion eines Nukleotids und die dadurch hervorgerufene Verschiebung des Leserahmens einen trunkierten Kanal, dessen C-Terminus inklusive der CNBD nach dem sechsten Transmembransegment fehlt. Die Konsequenz ist eine Sinusknotenbradykardie.

Eine Erhöhung von I_h oder eine Verschiebung der Aktivierungskinetik wurde im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben (Cerbai, Barbieri et al. 1994; Cerbai, Pino et al. 1997; Cerbai, Crucitti et al. 2000; Cerbai, Sartiani et al. 2001). Über einen weiteren Zusammenhang wurde bei Veränderungen des Spiegels der Schilddrüsenhormone berichtet (Pachucki, Burmeister et al. 1999; Gloss, Trost et al. 2001). Es wurde gezeigt, dass die Menge der HCN-Transkripte je nach Hormonspiegel im Ventrikel variiert. Die genauen Mechanismen sind nicht geklärt, möglicherweise führt ein erhöhter Sympathikustonus (z.B. auch bei Hyperthyreose) zu einer erhöhten ektopen I_h -Expression im ventrikulären Gewebe und auf diese Weise zu Tachyarrhythmien.

1.1.5 HCN-Knockout-Modelle

Über die tatsächliche Rolle der HCN-Kanäle an der Entstehung rhythmischer Aktivität in Nervenzellen und Kardiomyozyten gab es lange Zeit Diskussionen. Im Sinusknoten sind z.B. fünf Klassen von Kanälen an der Rhythmusentstehung beteiligt (HCN-Kanäle, drei Kalium- und zwei Calciumkanaltypen). Inzwischen sind für HCN1, 2 und 4 KO-Mauslinien erzeugt worden (Nolan, Malleret et al. 2003 (HCN1); Ludwig, Budde et al. 2003 (HCN2); Stieber, Herrmann et al. 2003 (HCN4)), die zur Aufklärung der physiologischen Funktionen dieser Kanäle beitragen.

HCN1

HCN1 wird im Gehirn vorwiegend im Cerebellum und im Cortex exprimiert. Die KO-Maus zeigt eine verminderte Leistung beim Erlernen von Aufgaben, die eine intakte motorische Koordination erfordern. Folgendes Modell wird aufgestellt: HCN1 reguliert die Lage des Ruhemembranpotentials der Purkinjoneuronen des Cerebellums und steuert deren Wiedererregbarkeit. Während schnellen repetitiven Aufgaben sorgt HCN1 dafür, dass die Neuronen ausreichend schnell in der Lage sind, auf synaptische Erregungen hin wiederholt zu feuern. Ohne HCN1 dauert die Herstellung der Wiedererregbarkeit zu lange, es kommt zu einer Art Inhibition der Motorik.

HCN2

Mit Hilfe der HCN2-KO-Maus konnten zwei physiologische Funktionen des Kanals nachgewiesen werden. Zum einen reguliert HCN2 im Sinusknoten das Ruhemembranpotential von Schrittmacherzellen. Eine Deletion führt zu einer Sinusknotenarrhythmie. KO-Tiere haben ein negativeres maximales diastolisches Potential, was dazu führt, dass die Dauer bis zum Erreichen des nächsten Aktionspotentials verlängert ist. Ohne HCN2 ist das Membranpotential anfälliger für Verschiebungen zu negativeren Potentialen. HCN2 scheint bei der sympathischen Stimulation der Herzfrequenz keine Rolle zu spielen, die HCN2-KO-Tiere erreichen bei Aktivität oder nach Injektion von Isoproterenol dieselben Herzraten (Stieber, Hofmann et al. 2004). Dafür ist möglicherweise auch der wesentlich größere Anteil von HCN4 am I_h -Strom verantwortlich (ca. 80% HCN4 und 20% HCN2 in der Maus (Ishii, Takano et al. 1999)). Im Thalamus unterdrückt HCN2 das Auftreten synchronisierter Oszillationen, die eine bekannte Ursache epileptischer Anfälle, sog. Absencen, sind. Diese können bei der HCN2-KO-Maus beobachtet werden.

HCN4

Embryonen mit einer Deletion von HCN4 sterben zwischen dem Tag 9,5 und 11,5. Zu diesem Zeitpunkt wird von einem vorläufigen Rhythmus auf den des voll entwickelten Herzens umgestellt (Hescheler, Fleischmann et al. 1997). HCN4 stellt den primären Schrittmacher des Herzens dar. Außerdem vermittelt HCN4, wie bereits erwähnt, die zentralnervöse Regulation der Herzfrequenz.

1.2 Zielstellung

Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es für HCN3 im Gegensatz zu HCN1, 2 und 4 keine detaillierten Daten. In der Literatur finden sich zu dieser Isoform kaum Berichte. Zur Gewebsverteilung ist bisher nur gesichert, dass HCN3 in einigen Gehirnregionen, vor allem im olfaktorischen Bulbus, exprimiert wird, jedoch bedeutend schwächer als die anderen Isoformen (Moosmang, Biel et al. 1999). Erst vor kurzem (nach Beginn dieser Arbeit) konnte HCN3 im Herzen nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung der HCN4-KO-Maus wurden HCN3-Transkripte in Kardiomyozyten gefunden (Stieber, Herrmann et al. 2003). Ein weiterer Nachweis gelang in einer Herzmuskelzelllinie (Sartiani, Bochet et al. 2002).

Grundlegende elektrophysiologische Daten zu HCN3 fehlen bisher ebenfalls. Die heterologe Expression ergab bislang nur sehr geringe Ströme, die gerade noch eine Abschätzung der Zeitkonstante ermöglichen. Weitere Parameter, z.B. ob HCN3 durch cAMP regulierbar ist oder nicht (wie HCN1) oder die Blockierbarkeit durch Inhibitoren konnten bislang nicht bestimmt werden. Es wurde auch die Frage aufgeworfen, ob HCN3 überhaupt einen Strom exprimiert (Nolan, Malleret et al. 2003).

Auch zur physiologischen Funktion und Relevanz von HCN3 gibt es bisher keine Anhaltspunkte. HCN3 ist in Wirbeltieren evolutionär konserviert, von Fischen bis hin zum Mensch wird diese Isoform exprimiert. Dies lässt auf eine bedeutende Funktion von HCN3 für den Organismus von Vertebraten schließen.

Durch die Untersuchung von heterolog exprimiertem HCN3 in einer Zellkultur ist die Aufklärung der beschriebenen Punkte nicht möglich. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine HCN3-Knockout-Mauslinie erstellt. Dieses Modell ermöglicht durch den direkten Vergleich von Wildtyp und Knockout die detaillierte Analyse des Phänotyps und damit der Funktion. Elektrophysiologische Untersuchungen können in bestimmten Zelltypen (z.B. Neuronen) oder unter physiologischen Bedingungen direkt im Gewebe durchgeführt werden und auf diese Weise die Bedeutung von HCN3 auf zellulärer Ebene aufklären.

Zusätzlich zum konstitutiven Knockout wurde eine konditionale Mauslinie erzeugt. Im Falle eines letalen Phänotyps durch das Fehlen von HCN3 in einem bestimmten Gewebe kann dann durch eine gewebspezifische Deletion in anderen Geweben die Funktion dort dennoch untersucht werden. Eine andere Anwendung kommt zum Tragen, wenn der beobachtete Phänotyp durch das Fehlen von HCN3 in mehreren verschiedenen Geweben ausgelöst werden kann. Die selektive Deletion kann hier Aufschluss über die tatsächliche Ursache des beobachteten Phänotyps geben.

Bisher gibt es noch keine Übersicht über das Expressionsmuster von HCN3 in den verschiedenen Organen. Aus diesem Grund wurde ein HCN3-spezifischer Antikörper hergestellt, mit dessen Hilfe die Lokalisierung des HCN3-Kanals durchgeführt werden sollte.

Aufgrund der schon bekannten Tatsache der sehr geringen Expression von HCN3, wurde zusätzlich eine Mauslinie verwendet, die das Reporterogen β -Galactosidase anstelle von HCN3 exprimiert. Dieses Enzym lässt sich durch eine spezifische Färbung oder mit Hilfe von Antikörpern gut detektieren.

Bei der Untersuchung des Phänotyps wurden verschiedene Bereiche abgedeckt. Zum einen wurden erste orientierende Tests des Verhaltens durchgeführt, da die Expression im Gehirn einen neuronalen Phänotyp erwarten lässt. Zum anderen wurden nach Feststellung der kardialen Expression von HCN3 auch hierzu funktionelle Untersuchungen durchgeführt.

2. Material und Methoden

Soweit nicht anders erwähnt wurden Chemikalien der Firmen Roth, Sigma oder Merck in den Qualitäten „für molekularbiologische Zwecke“ oder „pro analysi“ verwendet. Zur Herstellung sämtlicher Lösungen wurde sterilfiltriertes, hochreines Wasser (Easypure UV/UF, Barnstead) verwendet. Lösungen, die für kritische Anwendungen (z.B. PCR, RNS-Methoden) bestimmt waren oder über längere Zeit verwendet werden sollten, wurden autoklaviert.

2.1 DNS-Methoden

2.1.1 Amplifikation und Isolierung von Plasmiden

2.1.1.1 *Verwendete Plasmide*

pUC18 (Pharmacia)

pUC18 ist ein Klonierungsvektor, dessen multiple Klonierungsstelle (MCS) innerhalb der kodierenden Sequenz des α -Peptids der β -Galactosidase liegt. Werden E.coli-Stämme, deren lacZ-Gen (das für die β -Galactosidase kodierende Gen) zerstört ist (z.B. XL1-Blue von Stratagene), mit diesem Plasmid transformiert, lässt sich auf einem entsprechenden Agar eine Blau/Weiß-Selektion auf Einbau von Fremd-DNS durchführen. Enthält der Agar das Substrat X-Gal und ist der Vektor unverändert, kommt es durch Aktivität der β -Galactosidase zu einer Blaufärbung der Bakterienkolonie. pUC18 ist ein „high-copy“ Plasmid, welches in der Bakterienzelle in vielen Kopien vorliegt.

pBluescript II KS – (Stratagene)

Dieser Vektor ist ebenfalls ein Klonierungsvektor, der über die gleichen Eigenschaften wie pUC18 verfügt, dessen MCS aber eine größere Auswahl an Restriktionsstellen hat.

pBSloxPneoTKloxP

Dieser Vektor ist aus pBluescript II KS – entstanden. In die MCS wurden zwei als Selektionsmarker verwendete Gene integriert, die von zwei gleichgerichteten loxP-Sequenzen flankiert sind („gefloxt neo-tk-Kassette“). Die Neomycinphospho-transferase (neo) dient als positiver Selektionsmarker. Dessen Expression lässt Kolonien eukaryontischer Zellen überleben, die in einem G418-haltigen Medium kultiviert werden. G-418 ist ein Derivat des Neomycins. Im Gegensatz dazu ist die Thymidinkinase (tk) ein negativer Marker. Wird sie exprimiert, sterben Kolonien, die in einem Medium kultiviert werden, das Ganciclovir (ein Nucleosidanalogon) enthält.

pQE-30

pQE-30 ist ein von Qiagen konstruierter Vektor zur rekombinanten Expression von Proteinen, die N-terminal ein His-Tag (3.2) tragen sollen.

pBeloBAC11

pBeloBAC11 (GenomeSystemsInc) ist ein spezieller Vektor, der große genomische DNS-Fragmente (bis 240 kb) aufnehmen kann. Die klonierten Fragmente decken das gesamte Mausgenom ab. BAC steht für „bacterial artificial chromosome“. Durch Screening der gesamten BAC-Bibliothek mit Hilfe radioaktiver Sonden oder PCR-Primern können Klone mit dem gesuchten Genombereich identifiziert werden.

2.1.1.2 Kultivierung von *E.coli*.

Verwendet wurde der Stamm XL1-Blue MRF'(Stratgene). Dieser Stamm zeichnet sich dadurch aus, dass sich eine Blau/Weiss-Selektionierung mit X-Gal supplementiertem Medium durchführen lässt (2.1.1.1). Weitere Mutationen sorgen für die Stabilität der zu amplifizierenden Vektoren.

Die Kultivierung von *E.coli* erfolgte in mit Glucose angereichertem Luria-Bertani (LB) Medium (LB+). Das Medium wurde entweder für Flüssigkulturen verwendet oder nach Zusatz von Agar fest in Petrischalen. Zur Selektion der mit Plasmiden transformierten Bakterienkolonien wurde das Antibiotikum zugesetzt, dessen Resistenzgen auf dem Plasmid kodiert ist. Bis auf pBeloBAC11 (Chloramphenicol) enthielten alle hier verwendeten Plasmide ein β -Lactamasegen, das Ampicillinresistenz verleiht. Flüssigkulturen wurden bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt, Agarplatten bei 37 °C im Trockenschrank über Nacht inkubiert. Zur Aufbewahrung konnten Agarplatten für mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden. Bei Flüssigkulturen wurde ein Teil der Kultur mit sterilem Glycerol 85 % 1:1 gemischt und bei -80 °C gelagert.

Luria-Bertani Medium + Glucose		Luria-Bertani Agar + Glucose	
Pepton	10 g	Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g	NaCl	5 g
Glucose	1 g	Glucose	1 g
H ₂ O	ad 1000 ml	Agar	15 g
pH 7,2 - 7,5		H ₂ O	ad 1000 ml
		pH 7,2 - 7,5	

2.1.1.3 Transformation von *E.coli*

Transformation bezeichnet das Einbringen fremder DNS in Bakterien. Zyklische Plasmide mit einem eigenen Replikationsursprung, der von bakteriellen DNS-Polymerasen erkannt wird, werden in der Zelle vervielfältigt und bei der Zellteilung auf die Tochterzellen verteilt. Aufgrund des Antibiotikums im Medium kommt es zu einem Selektionsdruck, der dafür sorgt, dass die Bakterien die fremde DNS behalten.

Durch Behandlung mit DMSO werden Bakterien kompetent. „Kompetent“ bedeutet, dass die Zellwand geschädigt wurde, und so DNS in die Zellen eindringen kann. In diesem Zustand können sie eingefroren und zur Transformation wieder aufgetaut werden.

Zur Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit der plasmidhaltigen Lösung vermischt. Nach 10 Minuten auf Eis wurden 2,6 ml Medium zugegeben und die Zellen bei 145 rpm und 37 °C für eine Stunde geschüttelt. Im Anschluss wurden sie auf Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.1.4 Alkalische Lyse - Schnelltest (Miniprep)

Die auf der Agarplatte erhaltenen Kolonien wurden auf korrekte Transformation überprüft. Hierzu wurden einzelne Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher isoliert und antibiotikahaltige Flüssigkulturen angeimpft. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die in der Kultur gewachsenen Bakterien durch Zentrifugation bei 3500 rpm geerntet. Das Bakterienpellet wurde einer alkalischen Lyse (Birboim und Doly 1979) unterzogen.

Proteine und DNS werden durch einen Natronlauge- und SDS-haltigen Puffer denaturiert. RNase A zerstört die vorhandene RNS. Durch Neutralisation mit Kaliumacetat können anschließend die relativ kleinen Plasmide wieder renaturieren und in Lösung gehen, während die großen genomischen DNS-Fragmente mit den Zellresten durch Zentrifugation abgetrennt werden. Aus dem Überstand werden die Plasmide mit Ethanol präzipitiert (2.1.3.2).

Die erhaltene, relativ unsaubere DNS wurde zur Kontrolle der richtigen Transformation mittels Restriktionsverdau oder Sequenzierung verwendet.

2.1.1.5 Alkalische Lyse (Maxiprep)

Wurden größere Mengen sehr reiner Plasmide benötigt, wurden die Maxiprep-Kits der Firmen Quiagen bzw. Macherey-Nagel verwendet.

Das Verfahren beruht ebenfalls auf der alkalischen Lyse, verwendet jedoch zur Reinigung der Plasmide nach Entfernung der Zellreste und der genomischen DNS durch Zentrifugation oder Filtration zusätzlich eine Anionenaustauschersäule. Die Wasch- und Elutionspuffer sorgen für eine vollständige Abtrennung aller Verunreinigungen (RNS, Proteine und Salze). Nach Elution werden die Plasmide mit Isopropanol gefällt (2.1.3.2).

Mit einem positiven Klon des Plasmid-Schnelltests wurden 100 oder 500 ml Medium angeimpft und über Nacht geschüttelt. Die Bakterien wurden in der Großzentrifuge pelletiert und nach der Anleitung des Kits weiterbehandelt. Die Ausbeute aus einer 500 ml Kultur kann mehrere hundert Mikrogramm Plasmid betragen.

2.1.2 Isolation von genomischer DNS

2.1.2.1 Genomische DNS für die Genotypisierung

DNS für die Genotypisierungs-PCR erfordert keine aufwendige Behandlung und Reinigung. Das zu genotypisierende Gewebe (Zeh oder Schwanzspitze der Maus) wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäßen in 98 µl 1x PCR-Puffer und 2 µl Proteinase K (20 mg/ml, Roche oder Roth) bei 55 °C in einem Thermomixer (Eppendorf) mit 600 rpm 2 bis 12 Stunden inkubiert. Anschließend wurde zur Inaktivierung der Proteinase K für 15 Minuten auf 95 °C erhitzt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.1.2.2 Genomische DNS für Southern Blots

Um geeignete DNS für Southern Blots zu erhalten, wurden Gewebestücke oder Zellen mit Proteinase K (finale Konzentration 80 µg/µl) in Lysepuffer über Nacht bei 55 °C in einem Thermomixer (Eppendorf) mit 600 rpm oder in einem Trockenschrank (bei Stammzellen auf 96 well-Platten) über Nacht inkubiert. Die Inaktivierung der Proteinase K ist hier aufgrund der sich anschließenden Phenol-Chloroform-Extraktion (2.1.3.1) nicht nötig.

Lysepuffer	
Tris-Cl (pH 8.0)	20 mM
EDTA (pH 8.0)	5 mM
NaCl	400 mM
SDS	1 % (w/v)

2.1.3 Reinigung von DNS

2.1.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Extraktion entfernt sämtliche Proteine aus der wässrigen Phase. Die zu extrahierende Lösung wurde mit demselben Volumen einer Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (25:24:1, Roth) kräftig geschüttelt und bei 13000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Die wässrige, obere Phase, welche die DNS enthält, wurde in ein neues Gefäß überführt und nochmals kräftig mit demselben Volumen Chloroform geschüttelt, um restliches Phenol aus der Wasserphase zu entfernen. Die DNS wurde mit Ethanol gefällt (2.1.3.2).

2.1.3.2 Füllen von DNS

DNS wurde zur Reinigung oder Aufkonzentrierung mit Ethanol gefällt (Sambrook 2001). Die wässrige Lösung wurde mit 1/10 Volumen 5 M Natriumacetat und dem zweieinhalbfachen Volumen Ethanol gemischt. Nach 10 Minuten Inkubation wurde die entstehende DNS-Flocke bei 13000 rpm und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Bei kleineren Fragmenten (<500 Basenpaare) wurde die Inkubation bei -80 °C für 15-30 Minuten durchgeführt. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach nochmaliger Zentrifugation (13000 rpm 4 °C 5 Minuten) und Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac) für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in wenig Wasser wieder aufgenommen.

Eine Alternative ist die Fällung mit Isopropanol im Verhältnis 1:1. Nach der Zentrifugation des DNS-Pellets wird mit 70 % Ethanol gewaschen.

2.1.3.3 Elektroelution

Zur Extraktion von DNS-Fragmenten aus präparativen PAGE-Gelen wurde die Elektroelution eingesetzt. Unter UV-Kontrolle ausgeschnittene Gelstücke wurden mit 300 µl 1x TBE in einem die DNS zurückhaltenden Dialyseschlauch (Sigma D9652) in einer horizontalen

Elektrophoresekammer in 1x TBE bei 100 V für 2 Stunden eluiert. Die aus dem Gelstück in den Puffer übergegangenen DNS-Fragmente wurden mit Ethanol gefällt (2.1.3.2).

2.1.3.4 Verwendung des GFX-Kits zur Reinigung von DNS

Das GFX-Kit (Amersham) wurde zur schnellen Reinigung von DNS (z.B. nach Linearisieren eines Vektors) oder zur Extraktion von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen verwendet.

Die zu reinigende Lösung wird in den „capture buffer“ pipettiert, bzw. das zu extrahierende Gelstück im Puffer bei 65 °C geschmolzen. Die Lösung wird auf eine zentrifugierbare Säule pipettiert. Die Säule bindet DNS-Fragmente mit einer Länge ab 100 Basenpaaren. Nach Waschen der Säule mit ethanolhaltigem Puffer werden die zurückgehaltenen Nukleinsäuren mit Wasser eluiert.

2.1.4 Enzymatische Modifikation von DNS

2.1.4.1 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die spezifische, meist palindromische DNS-Sequenzen erkennen und spalten. Bei der Spaltung können entweder glatte Enden entstehen, bei denen beide DNS-Stränge an der gleichen Position getrennt werden („blunt ends“) oder es entstehen symmetrische Überhänge („sticky ends“). Auf diese Weise erhaltene DNS-Fragmente besitzen eine 5'-Phosphat- und eine 3'-OH-Gruppe und lassen sich daher wieder mit anderen Fragmenten ligieren (2.1.4.4). Sämtliche verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma NEB bezogen. Die zu verdauende DNS wurde im geeigneten Puffer (mitgeliefert) bei der optimalen Temperatur (meist 37 °C) für 90 Minuten (zur Analyse bzw. über Nacht für präparative Zwecke) mit dem Enzym inkubiert. Die erhaltenen Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese (2.1.5) untersucht oder gereinigt.

2.1.4.2 Phosphorylierung von Linkern

Zur Konstruktion eines Linkers aus zwei komplementären Primern müssen die 5'-OH-Enden zuerst phosphoryliert werden, da zur Ligation (2.1.4.4) ein 5'-Phosphatrest benötigt wird. Hierzu wurde die T4-Polynukleotidkinase (NEB) verwendet, die diese Reaktion unter ATP-Verbrauch katalysiert. Die beiden komplementären Primer wurden zusammenpipettiert (je 20 pmol), je nach Größe auf 80-90 °C erhitzt und langsam über ca. 30 Minuten abgekühlt. Dies ist zur korrekten Zusammenlagerung der beiden Primer notwendig. Der Ansatz wurde mit 20 U T4-Polynukleotidkinase und ATP-haltigem Puffer für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend bei 75 °C für 10 Minuten inaktiviert.

2.1.4.3 Dephosphorylierung von DNS

Die Dephosphorylierung 5'-endständiger Nukleotide des aufgeschnittenen Vektors verhindert bei der Ligation unerwünschte Ringschlüsse kompatibler DNS-Fragmentenden. Die Reaktion wird durch CIP („calf intestine phosphatase“, NEB) katalysiert. Nach der Restriktion des Vektors wurde mit 10 U CIP für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Phosphatase ist in allen Restriktionspuffern von NEB aktiv und kann so ohne vorherige Reinigung der DNS nach der

Restriktion eingesetzt werden. Im Anschluss an die Dephosphorylierung wurde die linearisierte Vektor-DNS gelelektrophoretisch (2.1.5) oder über eine Säule (GFX-Kit, 2.1.3.4) gereinigt.

2.1.4.4 Ligation von linearisierten DNS-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase (NEB) katalysiert unter ATP-Verbrauch die Verknüpfung von linearisierten DNS-Fragmenten (Vektor und zu integrierende DNS) zwischen einer endständigen 5'-Phosphat- und einer 3'-OH-Gruppe. Auf diese Weise entstehen rekombinierte zyklische Plasmide, bei denen die fremde DNS in die Sequenz des Vektors integriert wurde.

Für die Ligation wird in 15 µl Gesamtvolumen der linearisierte Vektor mit einem zwei- bis vielfachen Überschuss an zu integrierender Fremd-DNS, dem ATP-haltigen Ligasepuffer und 400 U Ligase zusammenpipettiert und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Mit den erhaltenen Plasmiden können dann wiederum Bakterien transformiert werden (2.1.1.3).

2.1.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten

Aufgrund der negativen Ladungen des Phosphatgerüsts der Nukleinsäuren lässt sich DNS im elektrischen Feld auf einem Gel nach der Größe auftrennen. Die Porengröße bestimmt dabei die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen DNS-Fragmente. Größere Fragmente bewegen sich langsamer als kleine. Durch Interkalation des fluoreszierenden Farbstoffes Ethidiumbromid können die aufgetrennten DNS-Banden im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Ein zum Vergleich auf das Gel aufgetragener Standard, der DNS-Fragmente mit bekannter Größe enthält, ermöglicht die Abschätzung der Größe der Banden. Aus der Intensität der Banden im Vergleich zu einer bestimmten Bande des hier verwendeten Markers (1 Kb DNA Ladder, Invitrogen) kann auch die ungefähre Menge der DNS bestimmt werden. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte am Geldoc 2000 (Biorad).

Lösungen

<u>10x TBE</u>		<u>Auftragepuffer (6x Dye)</u>	
Tris HCl	0,9 M	10x TBE	60 %
Borsäure	0,9 M	Ficoll Typ 400	18 %
EDTA pH 8,0	20 mM	EDTA pH 8,0	0,12 mM
		Bromphenolblau	0,15 %
		Xylencyanol FF	0,15 %

2.1.5.1 Agarosegele

Standardmäßig wurden zur Auftrennung von DNS-Fragmenten Agarosegele verwendet. Durch Variation der Agarosekonzentration lässt sich die Porengröße und damit der Größenbereich der optimal aufgetrennten DNS-Fragmente steuern. 0,7 % Agarose eignete sich für Trennungen im Bereich von 1 bis 15 kb, 2 % wurde zur routinemäßigen

Genotypisierung verwendet (Bandengröße 100 – 600 bp). Die entsprechende Menge Agarosepulver wurde in 1x TBE in der Mikrowelle unter Aufkochen geschmolzen, im Wasserbad auf 50 °C abgekühlt und mit 800 ng/ml Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml, Roth) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TBE (Laufpuffer) bei 100 bis 150 V, je nach Größe des Gels 30 Minuten bis mehrere Stunden. Der Fortschritt ließ sich anhand der beiden blauen Farbstoffe im Auftragepuffer verfolgen.

2.1.5.2 PAGE-Gele

5% PAGE-Gele eignen sich zur Auftrennung kleiner DNS-Fragmente im Bereich zwischen 20 und 1000 bp. Sie weisen eine bessere Trennleistung als 2% Agarosegele auf. Unterschiede der Fragmentgrößen von wenigen Basenpaaren sind deutlich zu sehen. PAGE-Gele wurden in einer Stärke von 0,75 mm (analytisch) bzw. 1,5 mm (präparativ) verwendet. Als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet.

5% PAGE-Gel

Rotiphorese Gel	3,75 ml
(Acrylamid/N, N'-Bisacrylamid = 29:1, 40 %ige wässrige Lösung)	
10x TBE	3 ml
H ₂ O	ad 30 ml
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin)	20 µl
20 % APS (Ammoniumperoxodisulfat)	70 µl

Die Laufbedingungen waren 100 V für 10 Minuten, anschließend 260 V für 50 Minuten. Die Färbung des Gels erfolgte durch 0,6 µg/ml Ethidiumbromid für 10 Minuten. Anschließend wurde zur Entfernung des überschüssigen Ethidiumbromids 5 Minuten mit Wasser gewaschen.

2.1.6 Polymerase-Kettenreaktion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR zu verschiedensten Zwecken eingesetzt und die Bedingungen jeweils speziell an die Erfordernisse angepasst. Die Reaktionen wurden mit einem Thermocycler T1 (Biometra) durchgeführt.

Lösungen

10x PCR-Puffer (Promega)

KCl	500 mM
Tris-HCl (pH 9.0)	100 mM
MgCl ₂	15 mM
Triton® X-100	1 %

dNTP-Stammlösung 1,25 mM

dGTP (100 mM)	10 µl
dATP (100 mM)	10 µl
dTTP (100 mM)	10 µl
dCTP (100 mM)	10 µl
H ₂ O	ad 800 µl

10x cloned Pfu-Puffer			
Tris-HCL pH 8,8	200 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄	100 mM
MgSO ₄	20 mM	Triton X-100	1 %
KCl	100 mM	BSA	1 mg/ml

Allgemeines Protokoll

Sämtliche PCR-Reaktionen wurden nach dem folgenden Protokoll durchgeführt.

Reaktionsansatz für die PCR	
DNS (je nach Konzentration)	0,5-4,0 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	2,5 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	2,5 µl
dNTP-Stammlösung	8,0 µl
10x PCR Puffer	5,0 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O	ad 50,0 µl

Tabelle 2.1-1 Reaktionsbedingungen für die PCR

(1) initiale Denaturierung	94°C	2-3 min	20-45 Zyklen
(2) Denaturierung	94°C	30 s	
(3) Primeranlagerung	50-68°C	30 s	
(4) Elongation	72°C	15-90 s	
(5) finale Polymerisation	72°C	5 min	

Folgende Bedingungen wurden angepasst: (1) die Dauer der initialen Denaturierung wurde bei genomischer DNS auf 3 Minuten verlängert, (3) die Temperatur zur Primeranlagerung wurde an die jeweilige Schmelztemperatur (6.1) angepasst, (4) die Elongationszeit wurde entsprechend des zu erwartenden Amplifikationsproduktes angepasst, pro 1000 Basenpaaren wurde eine Minute angesetzt. Die Zahl der Zyklen richtete sich nach der Konzentration der Ausgangs-DNS und nach dem Verwendungszweck (analytisch oder präparativ).

2.1.6.1 Fehlerkorrigierende PCR

Für präparative Zwecke, wie der Klonierung von Fragmenten, in die Mutationen eingefügt wurden, wurde eine rekombinante Pfu-Polymerase (Stratagene) verwendet. Sie ist im Vergleich zur Taq Polymerase in der Lage, mögliche Synthesefehler zu erkennen und zu korrigieren.

Der einzige Unterschied im Vergleich zum allgemeinen Protokoll bestand darin, dass die Elongationszeit verdoppelt wurde, da die Syntheserate nur etwa halb so hoch war.

2.1.6.2 Genotypisierung

Zur Bestimmung des Genotyps der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten und verwendeten Mauslinien (WT, KO, flox, CMV-Cre, lacZ und HCN3/βGal) wurden spezifische PCR-Protokolle entwickelt und aneinander angepasst, um diese Routinearbeit möglichst zu vereinfachen. Für alle PCR-Reaktionen war nur ein einziges Programm nötig, lediglich die verwendeten Primer sind (zum Teil) unterschiedlich. Es handelt sich um Multiplex-PCRs, das heißt, dass in einer Reaktion mehrere Primerpaare gleichzeitig vorliegen. Man erhielt

entsprechend mehrere Banden unterschiedlicher Größe. In den hier vorliegenden Fällen wurden pro Reaktion 3 Primer benutzt, einer davon konnte mit jedem der beiden anderen ein spezifisches Fragment erzeugen. Außerdem wurde der Standardreaktionsansatz auf das halbe Volumen reduziert, um Material zu sparen. Für die PCR wurden je 0,5 µl der genomischen DNS (2.1.2.1) eingesetzt. Die Position der Primer ist unter 3.4.2.1 beschrieben.

Ein besonderer Fall lag bei den Genotypen lacZ bzw. HCN3/βGal vor. Die Unterscheidung zwischen WT und lacZ bzw. HCN3/βGal erfolgte mit denselben Primern. Die Erkennung des Genotyps lacZ oder HCN3/βGal wurde mit einem weiteren Primersset vorgenommen.

Tabelle 2.1-2 Genotypisierungsprimersets

Mauslinie	Genotyp	Forward-Primer	Reverse-Primer	PCR-Fragment
KO	WT	A66F	RM13R	450
	KO	RM15F		401
flox	WT	A66F	RM13R	450
	flox		RM27R	350
lacZ bzw. HCN3/βGal	WT	A66F	RM13R	450
	lacZ	A54F		291
lacZ oder HCN3/βGal	lacZ	A71F	A63R	152
	HCN3/βGal		A69R	183
CMV-Cre	WT			-
	CMV-Cre	Cre Fwd	Cre Rev	~400

Tabelle 2.1-3 Reaktionsbedingungen für die Genotypisierungs-PCR

(1) initiale Denaturierung	95°C	3 min	42 Zyklen
(2) Denaturierung	95°C	1 min	
(3) Primeranlagerung	56°C	30 s	
(4) Elongation	72°C	30 s	
(5) finale Polymerisation	72°C	5 min	

2.1.6.3 Long Template- (LT-) PCR

Zur Amplifikation längerer DNS-Fragmente wurde das „Expand Long Template PCR System“ (Roche) verwendet. Durch die Kombination von Taq und einer fehlerkorrigierenden Polymerase ermöglicht es die exakte Amplifikation von bis zu über 20 kb großen Fragmenten.

Reaktionsansatz für die LT-PCR**Mix I**

DNS (je nach Konzentration)	0,5-4,0 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	2,5 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	2,5 µl
dNTP-Stammlösung	14,0 µl
H ₂ O	ad 25,0 µl

Mix II

10x LT Puffer	5,0 µl
LT-Polymerasemix	0,75 µl
H ₂ O	19,25 µl

Tabelle 2.1-4 Reaktionsbedingungen für die LT-PCR

(1) initiale Denaturierung	94°C	5 min	10 Zyklen
(2) Denaturierung	95°C	30 s	
(3) Primeranlagerung	50-68°C	30 s	
(4) Elongation	68°C	4 min	
(5) Denaturierung	94°C	30 s	20 Zyklen
(6) Primeranlagerung	50-68°C	30 s	
(7) Elongation	68°C	4 min + x	
(8) finale Polymerisation	68°C	7 min	

Während des Elongationschrittes (7) wird die Zeit mit jedem Zyklus um 10 Sekunden erhöht.

2.1.7 Sequenzierung

DNS-Sequenzierungen wurden mit einem ABI Prism 310 Sequencer (PE Applied Biosystems) durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Didesoxymethode (Sanger, Nicklen et al. 1977), bei der markierte Didesoxynukleotide mit Desoxynukleotiden während der PCR um die Integration in amplifizierte DNS-Fragmente konkurrieren und einen Kettenabbruch erzeugen. Bei günstigem Verhältnis von ddNTPs zu dNTPs entsteht ein Gemisch von DNS-Fragmenten, in dem alle möglichen Fragmentlängen vorhanden sind. Im verwendeten Reaktionsmix (ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit; PE Applied Biosystems) sind alle vier ddNTPs an vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt. Nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung der unterschiedlich langen fluoreszenzmarkierten Fragmente werden diese mittels Laser detektiert. Eine Software wertet die Sequenz aus.

Eine Sequenzierungsreaktion ermöglicht die Identifikation von bis zu 400 Basenpaaren. Für längere Sequenzen müssen mehrere überlappende Reaktionen angesetzt werden.

Reaktionsansatz für die Sequenzierung

DNS (200 ng)	0,5-4,0 µl
Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
Ready Reaction Mix	2,5 µl
H ₂ O	ad 12,0 µl

Tabelle 2.1-5 Reaktionsbedingungen für die Sequenzierreaktion

(1) initiale Denaturierung	95°C	2 min	30 Zyklen
(2) Denaturierung	95°C	30 s	
(3) Primeranlagerung	50°C	40 s	
(4) Elongation	60°C	4 min	

Zur Abtrennung nicht integrierter fluoreszierender Didesoxynucleotide wurden die erhaltenen Reaktionsprodukte mit Ethanol/Natriumacetat gefällt (250 µl Ethanol, 88 µl H₂O, 10 µl Natriumacetat). Anschließend wurde 20 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert, mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen, nochmals 5 Minuten zentrifugiert und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Nach Lösen des Pellets in TSR (Template Suppression Reagent, PE Applied Biosystems) zur Unterdrückung der Bildung doppelsträngiger DNS wurde die Lösung für 3 Minuten bei 95 °C denaturiert und sofort sequenziert oder bei -20 °C gelagert.

2.1.8 Southern Blot

Das Southern Blot Verfahren dient der Identifizierung eines bestimmten DNS-Fragments aus der Gesamt-DNS. Mittels Gelelektrophorese aufgetrennte DNS-Moleküle werden auf eine Membran übertragen, dort immobilisiert und mit radioaktiv markierten, spezifischen Sonden detektiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Southern Blots zur Restriktionskartierung des Introns 1 des HCN3 Genlokus und zur Analyse der ES Zellklone verwendet.

Lösungen:

20x SSC		Church-Puffer	
NaCl	175 g	BSA	5 g
Na ₃ Citrat-dihydrat	88,2 g	20 % SDS	175 ml
H ₂ O	ad 1000 ml	0,5 M EDTA pH 8	1 ml
TE-Puffer		1 M Na ₂ HPO ₄	193,5 ml
1 M TRIS pH 8,0	10 ml	1 M NaH ₂ PO ₄	56,5 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	2 ml	ssDNA	50 mg
H ₂ O	ad 1000 ml	H ₂ O	ad 500 ml

2.1.8.1 Gele

Zur Restriktionskartierung wurden 0,7 % Agarosegele, für das Screening der ES Zell Klone 0,6 % Gele verwendet, da relativ lange Fragmente nachgewiesen werden sollten. Nach der Elektrophorese (2.1.5.1) für bis zu 6 Stunden (große ES Zell Gele) wurden die Gele unter UV-Licht mit einem zusätzlichen Lineal fotografiert. Anhand der Laufstrecke der radioaktiv detektierten Bande lässt sich dann die entsprechende Größe mit Hilfe des mit aufgetragenen Standards feststellen (2.1.5). Anschließend wurden die Gele für 10 Minuten in 0,2 M Salzsäure geschwenkt. Dies führt durch partielle Depurinisierung zu Strangbrüchen, was den Transfer großer Fragmente auf die Membran erleichtert. Zur Denaturierung des DNS-Doppelstranges wurde das Gel dann für 30 Minuten in 0,5 M Natronlauge und 3 M Natriumchlorid geschwenkt. Nach einem abschließenden Neutralisationsschritt von 30 Minuten in 0,5 M TRIS pH 8,0 und 3 M Natriumchlorid konnte mit dem Membrantransfer begonnen werden.

2.1.8.2 Membrantransfer

Für den Transfer wurden die Membran (Genescreen Plus, NEN) und 2 Filterpapiere in Größe des Gels zugeschnitten und im Transferpuffer (10x SSC) für 15 Minuten äquilibriert. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut: In einer Metallwanne wurde ein ausreichend großer Schwamm mit 500 ml 10x SSC getränkt, auf den das erste Filterpapier und dann das Gel gelegt wurde. Auf dem Gel wurde die Membran platziert, darauf wiederum ein Filterpapier und schließlich ein Stapel Papierhandtücher, der durch den Druck und die Saugwirkung den Puffer mit den DNS-Fragmenten aus dem Gel in Richtung der Membran zieht. Die negativ geladenen DNS-Fragmente werden von der positiv geladenen Membran gebunden. Der Transfer wurde über Nacht durchgeführt. Anschließend wurde der Blot auseinandergebaut und die Lage der Membran markiert. Mittels UV Licht (CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP) und 2 Stunden Backen bei 80 °C wurden die DNS-Fragmente kovalent an die Membran gebunden.

2.1.8.3 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Die Sonden wurden nach der „Random primed labeling“ Methode synthetisiert (Random primed labeling Kit, Roche). Ein als Matrize dienendes DNS-Fragment wird mit Hexanukleotiden als unspezifischen Primern und dem Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I kopiert. Von den dafür benötigten Nukleotiden ist eines radioaktiv markiert und wird in den neusynthetisierten Strang mit eingebaut. Nach Abtrennung der verbliebenen, nicht eingebauten Nukleotide kann mit der radioaktiven Sonde das komplementäre DNS-Fragment auf der Membran hybridisiert und detektiert werden.

Reaktionsansatz für die radioaktive Markierung (20 µl)

Matrizen-DNS (100 ng)	7-9 µl
Reaktionsmix (Puffer, Hexanukleotide)	2 µl
dATP, dGTP, dTTP Mix (je 0,5 mM)	3 µl
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Amersham) 110 TBq/mmol	(nach Alter) 5-7 µl
Klenow-Fragment	1 µl

Die Matrizen-DNS wurde 10 Minuten bei 97 °C denaturiert und der Reaktionsansatz anschließend auf Eis pipettiert. Nach Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten wurde die Sonde über eine Säule (Nick-Column, Amersham) gereinigt. Die spezifische Aktivität der in 400 µl TE-Puffer gelösten Sonde wurde mit einem Szintillationszähler (Beckman LS 6500) bestimmt.

2.1.8.4 Hybridisierung

Die Hybridisierung wurde in einem Rollhybridisierer (Biometra Compact Line OV 4) durchgeführt. Nach drei Stunden Prähybridisierung der Membran bei 60 °C in 10 ml Church-Puffer wurde der Puffer durch die Sonde mit einer finalen Konzentration von 5×10^6 cpm/ml in insgesamt 10 ml Church-Puffer ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurde überschüssige und unspezifisch gebundene Sonde mit folgenden Waschschritten von der Membran gewaschen:

15 Minuten	2x SSC/0,1 % SDS	60 °C
30 Minuten	0,4x SSC/0,1 % SDS	65 °C
40 Minuten	0,4x SSC/0,1 % SDS	68 °C
60 Minuten	0,4x SSC/0,1 % SDS	68 °C

Die Membran wurde zwischen Klarsichtfolien gelegt und in einer Filmkassette auf eine Phosphorimager Platte aufgelegt. Diese wurde nach zwei bis drei Stunden mit einem Lesegerät (BAS-1500, Fujifilm) und entsprechender Software ausgelesen. Anschließend wurde ein Film (Hyperfilm MP, Amersham) aufgelegt und zwischen signalverstärkenden Folien in einer Filmkassette für sieben Tage bei -80 °C gelagert. Der Film wurde in einer Entwicklungsmaschine (curix 60, Agfa) entwickelt.

2.1.8.5 Rehybridisierung

Soll dieselbe DNS mit zwei verschiedenen Sonden hybridisiert werden, kann dies sequentiell durchgeführt werden, indem die erste Sonde von der Membran gewaschen und anschließend mit der zweiten Sonde inkubiert wird. Voraussetzung ist, dass die Membran ständig feucht gehalten wurde, da ansonsten die erste Sonde kovalent an die Membran gebunden würde.

Die Membran wurde zweimal bei 97 °C in 0,4x SSC/0,1 % SDS für jeweils 15 Minuten gewaschen. Zur Kontrolle wurde die Membran für etwa 24 Stunden auf eine Phosphoimager Platte aufgelegt. War kein Signal zu erkennen, wurde die Membran mit der zweiten Sonde rehybridisiert.

2.2 RNS-Methoden

Bei Arbeiten mit RNS wurde immer darauf geachtet, Kontaminationen mit RNAsen zu verhindern. RNAsen sind extrem stabile Enzyme die sich auch durch Autoklavieren bei 121 °C nicht zerstören lassen. Benötigte Glaswaren wurden mehrere Stunden bei 220 °C gebacken, Plastikwaren wie Eppendorfgefäße und Pipettenspitzen wurden aus frischen Packungen genommen.

2.2.1 Isolation von Gesamt-RNS aus Gewebe

Die Extraktion der RNS erfolgte mit Hilfe des TRIZOL Reagens (Invitrogen). TRIZOL enthält neben Phenol Guanidinisothiocyanat, welches RNAsen denaturieren und damit inaktivieren kann. Das zu extrahierende Gewebe wurde sofort nach der Präparation in zehnfacher Menge TRIZOL mit dem Ultraturax T8 (IKA Labortechnik) für zweimal 20 Sekunden homogenisiert (War die sofortige Verarbeitung nicht möglich, wurde das Gewebe in RNAlater (Quiagen) auf Eis gelagert oder eingefroren). Die homogenisierten Proben wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro Milliliter TRIZOL wurde 15 Sekunden kräftig geschüttelt und weitere 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation bei 11200 rpm (12000 g) und 4 °C für 10 Minuten wurde in einem neuen Eppendorfgefäß die RNS aus der wässrigen Phase mit 0,5 ml Isopropanol pro Milliliter TRIZOL gefällt. Die RNS wurde nach 10 Minuten Inkubation nochmals wie zuvor zentrifugiert. Die Trocknung erfolgte nach Waschen mit 70 % Ethanol und nochmaliger Zentrifugation (8800 rpm/7500 g, 4 °C, 5 Minuten) unter einer Horizontalflow (Köttermann). Die RNS wurde je nach Menge in 10 bis 50 µl DEPC-behandeltem Wasser bei 55 °C für eine Stunde gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.2 Reverse Transkription

Die cDNS-Synthese wurde mit dem Superscript II Kit (Invitrogen) durchgeführt. Die Gesamt-RNS wurde zuerst mit 2 U DNase I (NEB) verdaut, um mögliche Verunreinigungen durch DNS zu verhindern. Durch die Verwendung von Oligo(dT)-Primern wurde primär mRNS, deren Moleküle am 3'-Ende eine Poly(A)-Sequenz tragen, in Einzelstrang-cDNS umgeschrieben. Ein anschließender Verdau des RNS-Anteils des RNS-cDNS-Hybrids wurde mit RNase H (Invitrogen) durchgeführt.

2.3 Protein-Methoden

2.3.1 Membranpräparation von Proteinen aus HEK293-Zellen

Die mit den vier HCN-Kanal-Isoformen transfizierten Zellen wurden als Kontrollen für Western Blots verwendet. Da die Kanäle in der Zellmembran verankert sind, lassen sich durch Präparation der Mikrosomen (Zellfraktion, die sämtliche Membranen der Zelle einschließt) diese Proteine anreichern.

Die Zellen wurden in großen Flaschen (175 cm²) bis zur Konfluenz kultiviert und nach dem Ernten in PBS resuspendiert und zentrifugiert (1000 rpm, 5 Minuten).

Die gesamte Lyseprozedur wurde wegen der Instabilität der Proteine auf Eis durchgeführt. Das Pellet wurde in MOPS-Lysepuffer aufgenommen, dem Proteaseinhibitoren zugesetzt wurden. Die Zellen wurden mit einem Glas/Teflonhomogenisator (Braun) homogenisiert und die verbliebenen Zellreste bei 13000 rpm und 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und das Pellet noch zweimal wie eben beschrieben homogenisiert. Die vereinigten Überstände wurden in der Ultrazentrifuge bei 100000 g und 4 °C für 45 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 100 µl Lysepuffer aufgenommen und in 10 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

MOPS-Lysepuffer mit Proteinaseinhibitoren	
MOPS	20 mM
Sucrose	300 mM
EDTA pH 7,4	1 mM
Leupeptin (Calbiochem)	1 µg/ml
Pepstatin A (Sigma)	1 µM
Antipain (Calbiochem)	1 µg/ml
PMSF (Fluka)	100 µM
1,10-Phenanthrolin (Fluka)	1 mM
Benzamidin (Sigma)	1 mM
Jodacetamid (Sigma)	1 mM

2.3.2 Protein Isolation aus Gewebe

Das Gewebe wurde in Ethanol/Trockeneis schockgefroren und in einer auf Trockeneis vorgekühlten Reibschale zermahlen. Das erhaltene Pulver wurde in 2 ml Eppendorfgefäßen mit 2 % SDS/50 mM TRIS für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert, kurz gevortext und nochmals 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Das Puffervolumen war vom zu lysierenden Gewebe abhängig:

2 Retinae	100 µl
olf. Bulbus	100 µl
Hirn	1 ml
Herz	200 µl

Die Lysate wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.3.3 Quantifizierung von Proteinen

Der Proteingehalt wurde mittels der Bradford-Methode bestimmt. Hierzu wurde eine Standardreihe von 1-30µg Protein (BSA, bovines Serum Albumin) in je 100 µl 0,15 M NaCl nach Zugabe von je 1 ml Coomassie Lösung erstellt. Nach einer Minute bei RT wurde die Absorption bei 595 nm vermessen (Eppendorf Bio Photometer). Die Proteinproben wurden analog vermessen und vom Photometer anhand der Standardreihe quantifiziert.

Coomassie Lösung

Coomassie brilliant blue G250	50 mg
EtOH 95%	25 ml
H ₃ PO ₄	50 ml
H ₂ O	ad 500 ml

2.3.4 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen auf SDS-PAGE-Gelen

SDS-Polyacrylamidgele ermöglichen die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer Größe. Der Zusatz von SDS führt zur Denaturierung der Raumstrukturen. Die Proteine werden von den negativ geladenen SDS-Molekülen umhüllt. Auf diese Weise spielen für die Auftrennung eventuelle proteineigene Ladungen keine Rolle mehr (Laemmli 1970).

Lösungen

4 x Trenngelpuffer

Tris	1,5 M
SDS	0,4 %
pH 8,8	

10x TBS

Tris	12,1 g
NaCl	80,23 g
pH 8,0	

Ponceau-S-Lösung

Ponceau S	0,5 g
Eisessig	1 ml
H ₂ O	ad 100 ml

4x Sammelgelpuffer

Tris	0,5 M
SDS	0,4 %
pH 6,8	

7% Trenngel

PAGE-Stammlösung	3,5 ml
4xTrenngelpuffer	3,75 ml
H ₂ O	7,75 ml
20% APS	30 µl
TEMED	10 µl

10x Elektrophoresepuffer

Tris	30,2 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
H ₂ O	ad 1000 ml

6 x Probenpuffer (Lämmli)		Transferpuffer	
Tris-Cl/SDS pH 6,8	7 ml	10 x Elektrophorese-Puffer	80 ml
Glycerol	3 ml	Methanol	200 ml
SDS	1 g	H ₂ O	ad 1000 ml
Bromphenolblau	1,2 mg		
H ₂ O	ad 10 ml		
Sammelgel		Coomassie-Gelfärbungs-Lösung	
PAGE-Stammlösung	0,65 ml	Coomassie brilliant blue R-250	0,006 %
4x Sammelgelpuffer	1,25 ml	Eisessig	10 %
H ₂ O	3,05 ml	H ₂ O	90 %
20% APS	25 µl		
TEMED	5 µl		
Blockierungslösung		PAGE-Stammlösung	
Milchpulver	5 %	(Rotiphorese Gel 30)	
in 1x TBST		Acrylamid	30 %
		Bisacrylamid	0,8 %
10% Trenngel		TBST	
PAGE-Stammlösung	5 ml	Tween 20	0,1 %
4x Trenngelpuffer	3,75 ml	in 1x TBS	
H ₂ O	6,25 ml		
20 % APS	30 µl	Fixierlösung	
TEMED	10 µl	Isopropanol	25 %
		Eisessig	10 %
		H ₂ O	65 %

Durchführung

Das Gießen der Gele und die anschließende Elektrophorese wurde in einer Mini-Gel Apparatur (Protean 3, Biorad) durchgeführt. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine im Gel unspezifisch mit Coomassie angefärbt oder spezifisch durch Western Blot (2.3.5) nachgewiesen.

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit 6x Lämmli-Puffer versetzt, für 5 Minuten bei 95 °C im Wasserbad denaturiert und in die Taschen des Gels pipettiert. Als Größenstandard wurde der Benchmark Protein Ladder (Invitrogen) mit aufgetragen. Die Elektrophorese in 1x Elektrophoresepuffer dauerte bei 100 V etwa zwei Stunden.

Färben der Proteine im Gel

Das Gel wurde für 10 Minuten in Fixierlösung geschwenkt, anschließend eine Stunde in Coomassie-Gelfärbungs-Lösung. Nach Entfärben des Gels in 10 % Essigsäure bis zum

Auftauchen der Proteinbanden kann das Gel zur Dokumentation zwischen Folien gescannt werden.

2.3.5 Western Blot

Der Transfer wurde mit einem Tank-Blot System (Mini Trans Blot, Biorad) durchgeführt. Als Membran wurde eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) verwendet, die zuvor kurz in Methanol eingeweicht und dann für 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert wurde. Der Transfer wurde in vorgekühltem Transferpuffer mit einem zusätzlichen Kühlelement für eine Stunde bei 100 V und maximal 300 mA durchgeführt.

Die Membran wurde kurz getrocknet, um die Proteinbindung zu erhöhen, in Methanol wieder eingeweicht und die Proteinbanden mit Ponceau-S-Lösung gefärbt. Die Banden des Standards wurden mit Bleistift markiert. Die Membran wurde über Nacht in Blockierungslösung bei 4 °C geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran mit dem primären Antikörper in TBST und 1 % Milchpulver für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Auf drei Waschschritte in TBST folgte die Inkubation mit dem entsprechenden sekundären, peroxidasegekoppelten Antikörper für eine Stunde. Nach drei weiteren Waschschritten wurden die Antikörper mit Hilfe des ECL-Kits (Amersham) durch Chemolumineszenz detektiert. Dies geschah durch Auflegen eines Filmes (Hyperfilm ECL, Amersham).

Die verwendeten Antikörper und deren Konzentrationen sind im Anhang (6.2) beschrieben.

2.4 Herstellung eines polyklonalen anti-HCN3-Antikörpers

Zur Antigenexpression und anschließenden Aufreinigung wurde das QIAexpress Kit (Quiagen) verwendet.

Die Konstrukte werden „in frame“ in einen prokaryontischen Expressionsvektor (pQE-30) kloniert, der N-terminal für sechs Histidine (His-Tag) kodiert. Das His-Tag ermöglicht die Aufreinigung des exprimierten Proteins durch seine hohe Affinität zu Nickelionen, die komplex an Nitriloessigsäure (nitrioloacetic acid, NTA) und hierüber an Agarosebeads gebunden sind. Die Bindung des His-Tags an Nickel kann durch einen Puffer mit niedrigem pH wieder aufgehoben werden.

2.4.1 Präparative Proteinexpression

Alle vier klonierten Konstrukte wurden auf die Expression ihrer entsprechenden Proteine getestet. Eine Vorkultur (5 ml) wurde über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde mit der kompletten Menge die Hauptkultur angeimpft (50 ml) und diese weiter bei 37 °C geschüttelt. Mit Hilfe eines Photometers wurde die optische Dichte bestimmt. Nach Erreichen einer optischen Dichte von 0,6 wurde die Expression induziert.

Die Transkription der Antigenkonstrukte ist durch die konstitutive Aktivität eines Repressors (lac-Repressor) unterbunden. Durch Zugabe von IPTG (1 mM) wird dieser inaktiviert und es kommt zur Expression der rekombinanten Proteine.

Zum Zeitpunkt der Induktion und jede weitere Stunde wurde 1 ml der Kultur entnommen, um den zeitlichen Verlauf der Expression zu kontrollieren. Die Proben wurden bei 4000 rpm für fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert, das Pellet in 1x Lämmli-Puffer (2.3.4) resuspendiert und bis zur Analyse bei -20 °C eingefroren. Nach fünf Stunden wurde der Versuch beendet. Als Kontrollen wurden pQE-30 als leerer Vektor und die klonierten Konstrukte ohne Induktion durch IPTG kultiviert.

Zur weiteren Überprüfung des erhaltenen Proteins wurde ein Western Blot durchgeführt (2.3.5). 45 µg Protein wurden auf ein 15 % SDS-PAGE aufgetragen, auf eine PVDF-Membran gebロットet und über Nacht in 3 % BSA/TBS geblockt. Als primärer Antikörper wurde ein Maus anti-RGS-His Antikörper (Quiagen) in der Konzentration 1:2000 in 10 ml 3 % BSA/TBS für 1 Stunde verwendet. Dieser Antikörper erkennt spezifisch das 6-Histidin-Epitop mit den drei davor liegenden Aminosäuren Arginin (R), Glycin (G) und Serin (S), die auf dem Vektor pQE-30 zwischen Startcodon und His-Tag kodiert sind.

Zur Produktion des Antigens wurde das oben geschilderte Verfahren im Großmaßstab durchgeführt. Vier Kulturen mit jeweils 750 ml Medium wurden mit je 50 ml Vorkultur angeimpft und inkubiert, bis eine optische Dichte von 0,6 erreicht war. Nach Induktion mit IPTG (1 mM) wurde für 5 weitere Stunden inkubiert. Die Kultur wurde bei 5000 rpm und 4 °C für 10 Minuten pelletiert. Wegen des großen Volumens wurden die Zentrifugenbecher nach dem Abschütten des Überstands nochmals mit neuer Kultur befüllt und zentrifugiert. Zur Lyse wurden die Bakterienpellets in einem Ethanol-Trockeneisgemisch schockgefroren. Anschließend wurden die Pellets auf Eis wieder aufgetaut und in jeweils 3,5 ml TRIS-Lysepuffer pro Gramm Pelletgewicht resuspendiert. Es wurden verschiedene Lysebedingungen getestet, um den Anteil an degradiertem Protein möglichst gering zu halten und gleichzeitig eine ausreichende Ausbeute zu erhalten. Als optimal erwies sich, die Suspension nur eine Stunde bei Raumtemperatur unter Zusatz von Proteaseinhibitoren (Konzentration wie beim MOPS-Lysepuffer 2.3.1) zu schütteln. Wurde die Lyse bei 4° C durchgeführt, war die Ausbeute wesentlich geringer, während beim Schütteln für längere Zeit bereits wieder Degradation einsetzte. Die Zellreste wurden bei 8000 rpm und 4 °C für 30 Minuten in der Ultrazentrifuge abgetrennt.

TRIS-Lysepuffer

NaH ₂ PO ₄	100 mM
Tris-Cl	10 mM
Harnstoff	8 M
pH 8,0 mit NaOH	

2.4.2 Aufreinigung und Konzentration des Antigens

Jeweils 4 ml des Überstands nach der Lyse wurden mit einem Milliliter der Nickel-NTA-Agarosesuspension (Teil des QIAexpress-Kits) unter Schütteln bei Raumtemperatur für 1

Stunde inkubiert. Die Suspension wurde auf eine Säule geladen und langsam eluiert. Nach vollständiger Elution des Überstands wurde die Säule mit zweimal 16 ml TRIS-Waschpuffer gewaschen und anschließend das Antigen mit sechs mal 3 ml TRIS-Elutionspuffer von der Säule eluiert. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde mit der Bradford Methode (2.3.3) bestimmt. Protein enthaltende Fraktionen wurden vereinigt.

TRIS-Waschpuffer		TRIS-Elutionspuffer	
NaH ₂ PO ₄	100 mM	NaH ₂ PO ₄	100 mM
Tris·Cl	10 mM	Tris·Cl	10 mM
Harnstoff	8 M	Harnstoff	8 M
pH 6,3 mit NaOH		pH 3,75 mit HCl	

Das zur Immunisierung bestimmte Antigen wurde dreimal im 10fachen Volumen einer 1 % Mannitollösung über jeweils 12 Stunden bei 4 °C dialysiert, um die hohe Harnstoffkonzentration zu beseitigen. Die erhaltene Antigenlösung wurde auf drei Vials mit jeweils ca. 800µg Protein aufgeteilt und zur Stabilisierung gefriergetrocknet.

Eine weitere Großkultur wurde verwendet, um eine Immunoaffinitätssäule herzustellen, mit deren Hilfe HCN3-spezifische Antikörper aus dem Kaninchenserum isoliert werden konnten. Da hier eine wesentlich höher konzentrierte Antigenlösung benötigt wurde und zudem aufgrund des Verfahrens im Puffer keinerlei freie Aminogruppen (z.B. TRIS) vorhanden sein durften, wurde hier das Verfahren abgewandelt. Die verwendeten Puffer wurden auf Phosphat-Basis hergestellt. Das Verhältnis Pelletgewicht zu Phosphatlysepuffer war 2:1. Die sauren Antigen-Eluate wurden mit 2 ml 10 % Na₂HPO₄ neutralisiert. Die endgültige Aufkonzentration erfolgte mit zentrifugierbaren Membranfiltern, die Proteine ab 15 kD zurückhalten (Amicon Ultra 15, Millipore). Die Filter wurden 20 Minuten bei 2800 rpm (1100 g) und 32 Minuten bei 3500 rpm (1972 g) zentrifugiert.

Phosphat-Lysepuffer		Phosphat-Waschpuffer	
NaH ₂ PO ₄	50 mM	NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM	NaCl	300 mM
Harnstoff	8 M	Harnstoff	8 M
pH 8,0 mit NaOH		pH 6,3 mit NaOH	

Phosphat-Elutionspuffer	
NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
pH 4,0 mit NaOH	

2.4.3 Immunisierung von Kaninchen

Die Immunisierung wurde von der Firma Gramsch Laboratories (Schwabhausen, Deutschland) durchgeführt. Pro Kaninchen wurde ca. 1 mg Protein benötigt. Da die Effektivität der Immunisierung von Tier zu Tier unterschiedlich sein kann, wurden 2

Kaninchen verwendet. Testblutungen wurden dreimal im Abstand von einer Woche durchgeführt. Nach 4 Wochen wurden die Tiere ausgeblutet.

2.4.4 Aufreinigung des Antikörpers

Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe einer Immunoaffinitätssäule (AminoLink Kit, Pierce Biotechnology, Rockford, USA).

Das Antigen wird kovalent über vorhandene freie Aminogruppen an quervernetzte Agarosebeads gebunden. Während der Inkubation mit dem Antiserum binden die entsprechenden Antikörper an die immobilisierten Antigene. Unspezifische Antikörper und weitere Serumproteine werden von der Säule gewaschen. Die spezifischen Antikörper werden anschließend durch einen Puffer mit niedrigem pH von der Säule eluiert. Die Antikörperlösung wird sofort wieder neutralisiert, um eine Denaturierung der Antikörper zu verhindern.

Die Kopplung des Antigens an das Säulenmaterial und die Reinigung des Antikörpers wurde entsprechend dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt (<http://www.piercenet.com/files/ACF1E25.pdf>). Verwendet wurden ca. 9 mg Antigen. Um festzustellen, in welchen der zehn Eluate die Antikörper eluiert werden, wurde die Absorption bei 280 nm mit einem Photometer bestimmt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und in Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.4.5 Test der Antisera und der Antikörper

Die erhaltenen Antisera wurden in Western Blots (2.3.5) auf ihre Spezifität getestet. Als Testantigen wurde eine Membranpräparation von HCN3 aus stabil transfizierten HEK-Zellen verwendet. Zur Kontrolle dienten Membranpräparationen von untransfizierten bzw. mit HCN1, HCN2 und HCN4 transfizierten HEK-Zellen. Die Antisera wurden in einer Konzentration von 1:5000 verwendet.

Die aufgereinigten Antikörper wurden im Western Blot entsprechend den Antisera getestet. Zusätzlich wurde Immunzytochemie auf HCN3-transfizierten und untransfizierten HEK-Zellen in einer Konzentration von 1:500 verwendet. Der HCN3 Antikörper wurde mit einem sekundären Kaninchen-Antikörper (Alexa 546-konjugiert, 1:800, 6.2.2) detektiert.

2.5 Histochemie

2.5.1 Gewebeisolierung

Zur Isolation der hier verwendeten Gewebe (Hirn, Herz, olfaktorisches Epithel, Retina) wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Die Präparation wurde zügig und wenn möglich auf Eis durchgeführt, um eine Degradation der zu untersuchenden Proteine zu vermeiden.

2.5.2 Herstellung von Gewebeschnitten

Routinemäßig wurden Kryoschnitte angefertigt, deren Herstellung weniger aufwendig ist. Für Herzgewebe waren die erhaltenen Schnitte jedoch nicht verwendbar. Hier wurde auf die Paraffineinbettung ausgewichen, die Schnitte von guter Qualität erbrachte.

Lösungen

PBS		XGal-Färbelösung	
NaCl	8,0 g	K ₃ Fe(CN) ₆	5 mM
KCl	0,2 g	K ₄ Fe(CN) ₆	5 mM
Na ₂ HPO ₄ • 12 H ₂ O	2,9 g	MgCl ₂	2 mM
KH ₂ PO ₄	0,24 g	XGal Stammlösung	1 ml
H ₂ O	ad 1000 ml	PBS	ad 40 ml
pH 7.4			
0,2 M PB		Blockierlösung	
Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	28,8 g	BSA	1 %
NaH ₂ PO ₄	5,5 g	Normal Chicken Serum	2 %
H ₂ O	ad 1000 ml	in PBS	
pH 7.4			
4 % PFA/PBS bzw. PB		XGal-Stammlösung	
Paraformaldehyd	4 %	XGal	40 mg
in PBS bzw. PB		DMSO	1 ml
sterilfiltrieren			
		βGal-Fixierlösung	
		Formaldehyd	2 %
		Glutardialdehyd	0,2 %
		in PBS	
		sterilfiltrieren	

2.5.2.1 Kryoschnitte

Hirn

Das freipräparierte Gehirn (mit olfaktorischem Bulbus und Cerebellum) wurde für eine Stunde in 4 % PFA/PBS auf Eis inkubiert, anschließend dreimal für 30 Minuten mit PBS gewaschen. Über Nacht wurde das Gehirn in 30 % Sucrose/PBS zur Kryoprotektion bei 4 °C geschüttelt. Das Gewebe wurde in OCT (Tissue Tek, SCI Science Services) bei -80 °C eingebettet und gelagert.

Olfaktorisches Epithel

Nach der Entnahme des Gehirns wurde der restliche Schädel von überflüssigem Gewebe und dem Unterkiefer abgetrennt und nach kurzer Wäsche in PBS für 10 Minuten in β Gal-Fixierlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS für jeweils 5 Minuten wurden die Schädelknochen mit RDO (RDO-Apex) für zwei bis drei Stunden (je nach Alter der Tiere) entkalkifiziert, so dass sie geschnitten werden konnten. Es wurde dreimal mit PBS für jeweils 15 Minuten gewaschen und über Nacht mit 30 % Sucrose/PBS kryoprotectiert. Darauf folgten weitere zwei Stunden in 50 % Sucrose/PBS und anschließend zwei Stunden in einer 1:1 Mischung von 50 % Sucrose/PBS und OCT, davon die letzten 15 Minuten im Vakuum. Danach wurde nochmals eine Stunde in 100 % OCT inkubiert, wiederum die letzten 15 Minuten im Vakuum. Dies diente zur möglichst kompletten Füllung der Atemwege mit OCT.

Retina

Für Retinae wurde während des gesamten Protokolls sterilfiltriertes PB an Stelle von PBS verwendet. Die freipräparierten Augen wurden an der Ora serrata mit einer Kanüle eingestochen, für 5 Minuten mit 4 % PFA/PB auf Eis fixiert, dann entlang der Ora serrata aufgeschnitten, die Hornhaut und die Linse entfernt und nochmals für 10 Minuten bis zu einer Stunde fixiert. Nach dreimaligem Waschen in PB für jeweils 5 Minuten wurde über Nacht mit 30 % Sucrose/PB kryoprotectiert. Das Gewebe wurde in OCT bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingebettet und gelagert.

Die eingebetteten Gewebe wurden in einem Kryotom (HM-500, Microm) in einer Dicke von 12-14 μm geschnitten und auf Objektträger (Superfrost Plus, Roth) geschmolzen. Die Objektträger wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.5.2.2 Paraffinschnitte

Die freipräparierten Herzen wurden in der Mitte senkrecht zur Herzachse mit einem Rasiermesser geteilt, kurz in PBS gewaschen und für eine Stunde in 4 % PFA/PBS bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert. Das Gewebe wurde für zweimal 20 Minuten mit PBS gewaschen, anschließend über eine Ethanolreihe dehydriert und mit drei sukzessiven Paraffinbädern paraffinisiert:

kurz	Ethanol 50 %
3x 20 min	Ethanol 50 %
3x 20 min	Ethanol 70 %
3x 20 min	Ethanol 95 %
3x 20 min	Ethanol 100 %
kurz	Xylol
3x 10 min	Xylol
60 min	Paraffin I
60 min	Paraffin II
60 min	Paraffin III

Die eingebetteten Gewebe wurden mit einem Mikrotom (HM 335 E, Microm) in einer Dicke von 7 μm geschnitten und im Wasserbad bei $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf Objektträger (Superfrost Plus, Roth) aufgezogen. Die Schnitte wurden auf einem Heiztisch bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 Minuten getrocknet und im Kühlschrank bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Vor der Verwendung wurden die Schnitte auf folgende Weise rehydriert:

2x 3min	Xylol
3 min	Ethanol 100 %
3 min	Ethanol 95 %
3 min	Ethanol 70 %
3 min	Ethanol 50 %
3 min	Wasser

2.5.3 Detektion

Die verwendeten Antikörper und deren Konzentrationen sind im Anhang (6.2) beschrieben.

2.5.3.1 Nachweis über Immunfluoreszenz

Die Schnitte wurden mit 4 % PFA/PBS für zehn Minuten fixiert und dreimal für je fünf Minuten mit PBS gewaschen. Bei der Verwendung von Paraffinschnitten wurden zusätzlich die Antigene mit 0,1x SSC (2.1.8) bei 95 °C für fünf Minuten freigelegt und nochmals fünf Minuten mit PBS gewaschen. Die Blockierung der Schnitte erfolgte für eine Stunde in der Blockierlösung bei Raumtemperatur. Nach Waschen mit 1 % BSA/PBS für fünf Minuten wurde mit dem primären Antikörper über Nacht in Blockierlösung bei 4 °C inkubiert. Die Schnitte wurden dreimal mit 1 % BSA/PBS gewaschen und mit dem entsprechenden sekundären Antikörper in Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Objektträger wurden in einem Coplingefäß zweimal gewaschen und die Zellkerne mit 5 µg/ml Hoechst 33342 (Molecular Probes) in PBS für fünf Minuten gefärbt. Nach weiteren zwei Waschschritten in PBS für je fünf Minuten wurden die Schnitte mit dem wässrigen Einbett-Medium Permafluor (Beckman-Coulter) eingedeckelt und bei 4 °C gelagert.

2.5.3.2 Nachweis mit DAB-Färbung

Grundsätzlich entsprach das Vorgehen dem zum Nachweis über Immunfluoreszenz. Folgende zusätzliche Schritte wurden durchgeführt:

Nach der Fixierung wurden endogene Peroxidasen zerstört, die ansonsten zu einem erhöhten Hintergrundsignal führen würden. Die Schnitte wurden für 30 Minuten mit 3 % H₂O₂/40 % Methanol in PBS behandelt.

Nach Inkubation mit dem sekundären biotinylierten Antikörper (Dianova) wurde das Vectastain ABC-Kit (Vector Labs) verwendet. Die Schnitte wurden für 30 Minuten mit einer Mischung aus Avidin und biotinylierter Peroxidase (je 2 % Stocklösung) in PBS inkubiert. Nach zweimal fünf Minuten Waschen mit PBS wurden die Objektträger für zwanzig Minuten in ein Coplingefäß mit der DAB/Nickel-Färbelösung gestellt. Das für die Peroxidase benötigte H₂O₂ wurde insitu durch die Glucoseoxidase gebildet. Dies geschah für direkt zu vergleichende Schnitte (z.B. HCN3/βGal und WT) gleichzeitig in der gleichen Lösung. Die Objektträger wurden mit zweimal fünf Minuten PBS gewaschen, über eine Ethanolreihe (je 3 Minuten Ethanol 50 %, 70 %, 95 %, 100 %, Xylol) dehydriert und mit Roti-Histokitt (Roth) eingedeckelt.

DAB-Färbelösung

PBS	32 ml
DAB 0,54 %	4 ml
NH ₄ Cl 0,4 %	400 µl
Glucose 20 %	400 µl
(NH ₄) ₂ Ni(SO ₄) 1 %	3,2 ml
Glucoseoxidase	20 µl

2.5.3.3 XGal-Färbung

Gewebe der β Gal/HCN3-Reportermaus kann aufgrund der Aktivität der β -Galactosidase mit einem durch dieses Enzym spaltbaren Substrat angefärbt werden. X-Gal ist solch ein chromogenes Substrat, welches nach Abspaltung der Galactose einen intensiv blauen Indolfarbstoff freisetzt.

Alle verwendeten Lösungen enthielten zusätzlich 2 mM Magnesiumchlorid als Cofaktor für β -Galactosidase. Das komplette Gewebe oder Schnitte wurden wie oben beschrieben mit β Gal-Fixierlösung fixiert und nach 15 Minuten Waschen mit PBS mit der XGal-Färbelösung in einem Coplingefäß für 24 Stunden inkubiert. Nach fünf Minuten Waschen mit PBS wurde mit Permafluor eingedeckelt.

2.5.4 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Die Mikroskopie wurde mit einem Axioskop 2 (Zeiss) durchgeführt, das über eine Digitalkamera (HMRC, Zeiss) und eine Computersteuerung verfügt (Axiovision, Zeiss).

2.5.5 Konfokale Laser Mikroskopie

Das Konfokalmikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss) ermöglicht es, optische Sektionen im Präparat darzustellen, Streulicht aus anderen Ebenen wird ausgeschlossen. Dadurch ergibt sich eine wesentlich höhere Auflösung als sie mit normaler Mikroskopie zu erreichen ist. Die sequentielle Abtastung des Präparats mit verschiedenen Laserlinien lässt auch eine Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zu, deren Emissionsspektren sich zum Teil überschneiden.

2.6 Kultur eukaryontischer Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die permanente Zelllinie HEK 293 (ACC 305, DMSZ) verwendet. HEK-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen (**h**uman **e**mbrionic **k**idney cells), die durch stabile Transfektion mit dem humanen Adenovirus Typ 5 immortalisiert sind. Diese Zellen wurden stabil mit einem HCN3 exprimierenden DNS-Konstrukt transfiziert und für elektrophysiologische Messungen und zum Test des erstellten Antikörpers (2.4.5) verwendet.

Es wurden zwei verschiedene Konstrukte erstellt. Nachdem die Expression im pcDNA3-Vektor für die Elektrophysiologie zu gering war, wurde die murine HCN3 cDNS in den Vektor pREP4 umklont und auch diese ebenfalls stabil in HEK293 Zellen transfiziert.

2.6.1 Medien

Basismedium

Als Medium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Nr. 21885-025, GIBCO) verwendet. Diesem wurden 10 % fötales Rinderserum (FBS, Nr. S0115, Biochrom) und Antibiotika (Penicillin G 100 U/ml und Streptomycin 100 µg/ml, Biochrom) zugesetzt.

Selektionsmedium

Je nach Konstrukt wurde dem Basismedium G-418 in einer Konzentration von 400 µg/ml (pcDNA3) oder Hygromycin in einer Konzentration von 200 µg/ml (pREP4) zugesetzt.

Einfriermedium

Basismedium mit 10 % DMSO

2.6.2 Kultivieren von HEK-Zellen

Gefrierstocks von HEK-Zellen wurden unter fließendem kaltem Wasser aufgetaut und direkt in einer 75 cm² Flasche mit 12 ml Basismedium ausgesät. Bei transfizierten, HCN3 exprimierenden HEK-Zellen wurde 24 Stunden später Selektionsmedium mit der halben Konzentration von G-418 bzw. Hygromycin verwendet. Die Zellen wurden bei Konfluenz 1:10 passagiert bzw. in eine 175 cm² Flasche umgesetzt. Zur Passagierung wurde nach Waschen mit PBS Trypsin/EDTA (Mengen: Tabelle 2.8-1) zugesetzt und die Flasche geschwenkt, bis sich die Zellen abgelöst haben. Nach Zugabe des doppelten Volumens Medium werden die Zellen gut resuspendiert und entweder wieder ausplattiert oder zur Erstellung von Gefrierstocks in einem Röhrchen zentrifugiert (1000 rpm, 5 Minuten), in Einfriermedium resuspendiert und in Cryoröhrchen bei -196 °C gelagert.

2.6.3 Stabile Transfektion von HEK-Zellen

Zur stabilen Integration des cDNS-Konstrukts in das Genom wurden jeweils 9 µg der Vektoren mit SspI linearisiert. Die Elektroporation erfolgte analog zu 2.8.4.4 mit folgenden Änderungen:

Es wurden $8 \cdot 10^6$ Zellen verwendet

Die Elektroporationsbedingungen waren 1000 V und 25 µF

Es wurden 8 Petrischalen ausplattiert (6 Platten mit 10 % und 2 Platten mit 20 % der elektroporierten Zellsuspension). Eine weitere Platte mit nicht transfizierten HEK-Zellen diente als Kontrolle für die Effektivität des Selektionsmediums.

2.6.4 Selektion und Isolation stabil transfizierter Zellen

48 Stunden nach der Elektroporation wurde das entsprechende Selektionsmedium zugegeben. Sobald einzelne überlebende Klone zu erkennen waren, wurden diese isoliert und nach Trypsinierung und Resuspendierung in 24 well-Platten einzeln unter Selektionsmedium kultiviert. Die einzelnen Klone wurden bis auf 25 cm² Flaschen passagiert und Gefrierstocks erstellt.

2.7 Genetische Modifikation von Tieren

Die systematische Aufklärung der Funktion bestimmter Gene wurde durch die Entwicklung transgener Tiermodelle wesentlich vereinfacht. Die Erzeugung solcher Modelle lässt sich entweder durch zufällige Integration von Genen oder durch zielgerichtete homologe Rekombination („gene targeting“) erreichen. Der Nachteil des erstgenannten Verfahrens ist, dass die Integration des Gens zur Zerstörung anderer Gene führen kann, was die Analyse des Phänotyps erschwert. Außerdem lässt sich auf diese Weise ein Gen meist nur überexprimieren. Die Ausschaltung eines bestimmten Gens ist nur über eine dominant negative Mutante des Zielgens möglich, die jedoch erst bekannt sein muss. Der Vorteil dieser Methode ist der geringere Aufwand. Am Rande sei eine weitere Methode erwähnt. Mit Hilfe von Viren lässt sich siRNA (short interfering RNA) in das Genom eines Lebewesens integrieren. Die siRNA führt zum Abbau der mRNS, gegen die sie gerichtet ist, durch zelleigene Systeme. Auf diese Weise wird ein „knock-down“ des Zielgens erreicht, der allerdings meist nicht vollständig ist.

Die homologe Rekombination erlaubt die exakt definierte Veränderung des Gens, dessen Funktion man untersuchen möchte. Es lässt sich inaktivieren, durch Mutationen zielgerichtet verändern oder bei Bedarf durch ein völlig anderes Gen ersetzen. Ein Beispiel für die letztgenannte Möglichkeit ist die Integration eines Reporterkonstrukts, welches an Stelle des ursprünglichen Gens und unter dessen Promotors exprimiert wird und dessen Aktivität leicht nachgewiesen werden kann. Die Methode des „gene targeting“ wurde erstmals vor ca. 15 Jahren beschrieben (Jaenisch 1988; Capecchi 1989).

Das Verfahren umfasst mehrere Schritte. Zuerst wird ein Vektor konstruiert. Dieser wird in embryonale Stammzellen (ES Zellen) transferiert, die wiederum zur Erzeugung von Mäusen verwendet werden. ES-Zellen sind pluripotent, also noch nicht differenziert, und besitzen daher die Fähigkeit, alle Gewebe eines Organismus zu bilden.

Der Vektor besteht aus der zu verändernden Gensequenz, zwei zum Genlokus homologen Bereichen an jedem Ende und zwei weiteren Genen, die eine Selektion erlauben. Die beiden homologen Regionen sind komplementär zu spezifischen Stellen in der unmittelbaren Umgebung des zu verändernden Bereichs. Der Vektor lagert sich im Genom der Stammzelle an den beiden homologen Regionen an. Die Methode nutzt nun das Prinzip der Rekombination zum Austausch der ursprünglichen Sequenz durch die des Vektors. Dies bezeichnet man als erstes Targeting.

Um die Stammzellen zu isolieren, in denen die Rekombination erfolgt ist, enthält die veränderte Gensequenz zwei zusätzliche Gene, das Neomycin-Resistenzgen und die Thymidinkinase. Die Expression der Neomycinphosphotransferase nach der Integration in das Stammzellgenom führt dazu, dass die Zelle resistent gegen Neomycin (bzw. G-418) ist. Alle anderen Stammzellen, bei denen die Rekombination nicht erfolgt ist, sterben unter Neomycin ab (positive Selektion). Die im ersten Targeting benötigten Selektionsgene können die Transkription des zu untersuchenden Gens stören. Aus diesem Grund müssen sie wieder entfernt werden. Dies ist vor allem wichtig für die Erzeugung eines konditionalen Knockouts oder einer Mutation.

Ein konditionaler Knockout ermöglicht die Deletion eines Genbereichs in einem bestimmten Gewebe und/oder zu einem gewünschten Zeitpunkt, während der konstitutive („normale“) Knockout global und bereits in der befruchteten Eizelle aktiv ist.

Um die Entfernung der beiden zusätzlichen Gene zu ermöglichen, werden sie „gefloxt“, das heißt, sie werden von zwei loxP-Seiten flankiert (Abbildung 2-1 A). Gefloxt Sequenzen können durch die Verwendung der Cre Rekombinase („cre“ für „cyclization recombination“) aus dem Genom deletiert werden (Gu, Zou et al. 1993). Im zweiten Targeting werden die korrekt rekombinierten Stammzellen aus dem ersten Targeting transient mit der Cre Rekombinase transfiziert. Die gefloxt Selektionskassette wird auf diese Weise ausgeschnitten und damit auch die Thymidinkinase. Stammzellen, bei denen die Cre-vermittelte Rekombination nicht funktioniert hat, werden abgetötet, wenn sie mit dem Nukleosidanalogon Ganciclovir behandelt werden (negative Selektion).

Übrig bleiben Stammzellen, die zuerst das Transgen integriert und anschließend im zweiten Schritt die Selektionskassette deletiert haben. Diese werden in Blastozysten injiziert. Die Blastozysten werden wiederum in Leihmütter transplantiert und von diesen ausgetragen.

Zur Erstellung eines konditionalen Knockouts wird die Methode abgewandelt. Hier wird zusätzlich zu den zwei loxP-Seiten der Selektionskassette eine weitere in den Vektor eingefügt (Abbildung 2-1 B). Diese umschließt zusammen mit einer der loxP-Seiten der Kassette die konditional zu deletierende Sequenz (Abbildung 2-1 B). Sie ist damit ebenfalls „gefloxt“. Im zweiten Targeting kann es jetzt zu mehreren verschiedenen Rekombinationsereignissen kommen. Es entstehen sowohl konditionale als auch konstitutive Knockout-Allele.

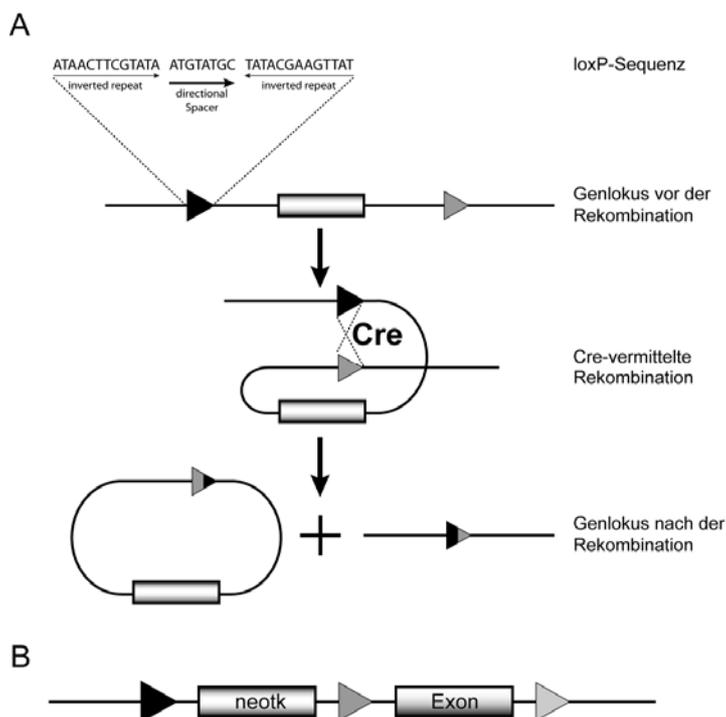


Abbildung 2-1 Cre-vermittelte Rekombination

(A) Zwei gleichgerichtete loxP-Seiten flankieren die zu deletierende Sequenz. Eine rekombinierte loxP-Seite wird zusammen mit dem deletierten Bereich entfernt, die zweite verbleibt am Genlocus. (B) Schema eines konditionalen Vektors mit einer dritten, gleichgerichteten loxP-Seite, alle drei können paarweise miteinander rekombinieren und die jeweils dazwischenliegenden Sequenzen deletieren.

2.8 Stammzellkultur und ES Zell Targeting

Vorrangiges Ziel bei der Kultur embryonaler Stammzellen (ES Zellen) ist die Erhaltung der Pluripotenz. Aus diesem Grund wurden die Stammzellen während der gesamten Prozedur auf so genannten Feederzellen kultiviert, die durch Abgabe bisher nicht identifizierter Faktoren eine Differenzierung unterdrücken. Feederzellen sind embryonale Fibroblasten, die aus 14,5 Tage alten Mausembryonen gewonnen werden. Zusätzlich wurde dem Medium Leukämie inhibierender Faktor (LIF) zugesetzt.

Die verwendeten Protokolle entstammen dem Buch „Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual“, Hogan et. al, 2. Ausgabe 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

2.8.1 Herkunft der Stammzellen

Als ES-Zellen wurden Stammzellen der Zelllinie R1 (Nagy, Rossant et al. 1993) verwendet. Zu Beginn befanden sich diese in der 15. Passage.

2.8.2 Material, Nährmedien und Lösungen

Sämtliche verwendete Kulturgefäße (Petrischalen und Flaschen) wurden von der Firma Sarstedt bezogen.

Tabelle 2.8-1 Benötigte Volumina für die ES Zellkultur

	Medium/ PBS	Trypsin/EDTA
175 cm ² Flasche	20 ml	4 ml
75 cm ² Flasche	12 ml	3 ml
25 cm ² Flasche	5 ml	1 ml
Petrischale	10 ml	2 ml
96 well-Platte	200 µl/well	30 µl/well
24 well-Platte	1,5 ml/well	300 µl/well
6 well-Platte	4 ml/well	700 µl/well

ES Medium

Als Basismedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Glucose (DMEM High Glucose, Nr. 31966-021, GIBCO) verwendet. Diesem wurden 20% fötales Rinderserum (FBS, Nr. S0115, Biochrom), 5×10^5 Einheiten LIF (Chemicon) und 0,1 mM β -Mercaptoethanol zugesetzt. Hierfür wurde einer 500 ml Flasche DMEM das entsprechende Volumen Medium entnommen und mit den Zusätzen wieder aufgefüllt.

Da ES Zellen gegenüber Veränderungen zwischen einzelnen Chargen des FBS empfindlich sein können, wurde deren Wachstum zuvor in verschiedenen Chargen getestet. Eine geeignete Charge (437A) wurde dann bei GIBCO in ausreichender Menge reserviert.

LIF wurde in 10^7 Einheiten bezogen. Es wurde in mit DMEM/20 % FBS auf 20 ml verdünnt und in 1 ml Aliquots (entspricht 5×10^5 Einheiten) bei 4 °C in Kryoröhrchen gelagert.

Selektionsmedien

Für das erste Targeting wurde dem Medium G-418 (Geneticin, GIBCO) in einer Konzentration von 400 µg/ml zugesetzt.

G-418 Substanz wurde eingewogen und in einer Konzentration von 40 mg/ml in PBS gelöst. Die Lösung wurde sterilfiltriert und in 5 ml Aliquots (ausreichend für eine Flasche Medium mit 500 ml) in Kryoröhrchen bei -20 °C gelagert.

Für das zweite Targeting wurde dem Medium Ganciclovir (Cymeven, Roche) in einer Konzentration von 2 µM zugesetzt.

Eine Ampulle Ganciclovir Trockensubstanz (500 mg) wurde in 7,84 ml Wasser gelöst (250 mM) und nach 1:25 Verdünnung (10 mM) und Sterilfiltration in 1 ml Aliquots bei 4 °C gelagert. Dem Medium wurden entsprechend 100 µl zugesetzt.

Trypsin/EDTA

Zur Ablösung der adherenten ES Zellen während der Passagierung wurde 1x Trypsin/EDTA (GIBCO) verwendet.

Zur Vereinzelnung der Zellen isolierter Klone wurde 2x Trypsin/EDTA verwendet. Hierfür wurde 10x Trypsin/EDTA (GIBCO) mit PBS 1:5 verdünnt und in 10 ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

ES Einfriermedium

ES Medium mit 10 % DMSO

EF Medium

DMEM mit 10 % FBS

2x EF Einfriermedium

DMEM mit 10 % FBS und 20 % DMSO (wird 1:1 mit EF Medium auf 10 % DMSO verdünnt)

2.8.3 Feederzellen

Da die Feederzellen die Selektion mit G-418 überstehen müssen, wurden embryonale Fibroblasten benötigt, die eine Neomycinresistenz aufweisen. Hierfür wurden CNGA3 KO-Männchen mit WT Weibchen verpaart. Dadurch sind alle Embryonen heterozygot für die Neomycinphosphotransferase. Diese liegt im CNGA3 KO-Lokus (Biel, Seeliger et al. 1999).

2.8.3.1 Gewinnung embryonaler Fibroblasten

Die CNGA3 KO-Männchen wurden über Nacht mit 2 WT Weibchen zusammengesetzt. Am nächsten Morgen wurden die Weibchen auf einen vaginalen Pfropf aus Samenflüssigkeit untersucht (plug check). Bei positiven Weibchen wurde dies als Schwangerschaftstag 0,5 (entsprechend dem Alter des Embryos) bestimmt. Am Tag 14,5 post coitum wurden die Embryos präpariert. Das schwangere Weibchen wurde durch zervikale Dislokation getötet, in 70 % Ethanol gebadet und die Bauchdecke aufgeschnitten. Der Uterus wurde herausgelöst und in eine mit 12 ml 1x PBS gefüllte Petrischale überführt. Die Embryos wurden in eine neue, ebenfalls mit 1x PBS gefüllte Petrischale gegeben. Der Kopf der Embryos wurde entfernt, der Korpus wieder in eine neue Petrischale überführt. Aus dem Korpus wurden Herz, Leber und Lunge (dunkelrot gefärbte Organe) herausgenommen. Währenddessen wurde in ein 50 ml Röhrchen (Falcon) 1 ml 1x Trypsin/EDTA pro Embryo vorgelegt. Die Embryonen wurden mit einer Schere zerkleinert und in vorgelegtem Trypsin 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde mit immer kleineren Pipetten homogenisiert (25 ml Pipette 10 ml Pipette 5 ml Pipette), noch einmal 10 min bei 37 °C inkubiert und wieder mit Pipetten homogenisiert (jetzt zusätzlich einer mit 2 ml Pipette). Pro Embryo wurden 1,5 ml EF Medium zugegeben. Die Zellsuspension wurde erneut sehr intensiv (5-10 min) mit einer Pipette homogenisiert. Das Röhrchen wurde stehen gelassen, damit Zelltrümmer absinken konnten. Währenddessen wurden pro Embryo 2 Zellkulturflaschen (175 cm²; Greiner) vorbereitet. Es wurden 19 ml EF-Medium in jede Zellkulturflasche vorgelegt und 1 ml Überstand der Zellsuspension dazugeben.

2.8.3.2 Kultivierung und Passagierung der Feederzellen

Die Inkubation der Feederzellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach ungefähr 3 Tagen Inkubation war die Zellkulturflasche konfluent bewachsen. Daraufhin wurden die Zellen noch zwei weitere Tage inkubiert. Das Medium in der Zellkulturflasche (175 cm²) wurde abgesaugt. Der Zellrasen wurde mit 20 ml 1x PBS gewaschen. 4 ml 1x Trypsin/EDTA wurden dazugeben und 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 6 ml EF Medium wurde die Zellsuspension homogenisiert. 9 ml dieser Zellsuspension wurden in 50 ml-Röhrchen (Falcon) überführt. Die restlichen 1 ml in den Flaschen wurden mit 19 ml EF Medium aufgefüllt und wieder bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellsuspensionen aus 5 Zellkulturflaschen wurden jeweils in einem 50 ml Röhrchen vereinigt. Die Röhrchen mit der Zellsuspension wurden 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Jeweils 2 Pellets wurden in insgesamt 20 ml EF Medium resuspendiert und vereinigt.

2.8.3.3 Bestrahlung

Da die Feederzellen einen einschichtigen Zellrasen ausbilden sollten, wurden sie durch Bestrahlung mit energiereicher Strahlung (Röntgenstrahlung) teilungsunfähig gemacht. Der Metabolismus der Zellen wurde dadurch kaum beeinträchtigt. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte im Max Planck Institut für Biochemie in Martinsried. Die Zellen waren während des Transports abgesunken. Das gebildete Pellet wurde mit 5000 Rad (entsprach 4,41 min) bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde das Pellet durch vorsichtiges Schwenken wieder aufgelöst.

2.8.3.4 Gefrierstocks

Die bestrahlten Zellsuspensionen wurden 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Jedes Pellet wurde in 15 ml EF Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 15 ml 2x EF Einfriermedium wurden 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen pipettiert (10 Flaschen ergaben 30 Aliquots), sofort auf Eis gestellt und langsam eingefroren (bei -80 °C in einer Styroporbox). Die Lagerung erfolgt im flüssigen Stickstoff bei -196 °C. Nach ungefähr 4 Tagen waren die 20 Zellkulturflaschen wieder konfluent bewachsen. Diese Zellen wurden ebenfalls wie oben beschrieben behandelt. Insgesamt wurden 4 Passagen Feederzellen hergestellt.

Zum Test Dichte des Feederzellrasens wurde von jeder Charge und Passage ein Aliquot aufgetaut und auf einer 10 cm Petrischale (78 cm²) ausgesät. Anhand der ermittelten Dichte wurde die nötige Menge pro Fläche abgeschätzt.

2.8.3.5 Auftauen der Feederzellen

In ein Röhrchen wurden je 3 ml EF Medium pro aufzutauendem Aliquot vorgelegt. Die Kryoröhrchen wurden schnell im 37 °C Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspensionen wurden sofort in das vorgelegte EF Medium überführt. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet im benötigten Volumen EF Medium resuspendiert. Sollten Stammzellen noch am selben Tag auf den Feederzellen ausgesät werden, wurde direkt ES Medium verwendet. Die Feederzellen waren nach ca. zwei Stunden adherent.

2.8.4 Erstes ES Zell Targeting

2.8.4.1 Auftauen von Stammzellen

Am Vorabend wurden Feederzellen in einer 25 cm² Flasche ausgesät (2.8.3.5). Vor dem Auftauen der Stammzellen wurde das EF Medium gegen ES Medium ausgetauscht. Das Kryoröhrchen mit den ES Zellen wurde schnell im 37 °C Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspensionen wurden sofort in 3 ml vorgelegtes ES Medium überführt. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und mit 4 ml ES Medium wieder resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation und Resuspendierung wurden die Zellen in die 25 cm² Flasche überführt. Die Inkubation erfolgte bei 5 % CO₂ und 37 °C. Das ES Medium wurde im Verlauf der ganzen Prozedur jeden Tag gewechselt.

2.8.4.2 Splitten von Stammzellen

Bei maximal 60-70 % Konfluenz wurden die ES Zellen gesplittet (wachsen die Klone ineinander, besteht die Gefahr, dass sie differenzieren und ihre Pluripotenz verlieren). Die Zellen wurden zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und mit 1 ml 1x Trypsin/EDTA für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml ES Medium wurden die Zellen resuspendiert und in ein Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, anschließend in 5 ml ES Medium resuspendiert und in eine mit Feederzellen vorbereitete 75 cm² Flasche überführt.

2.8.4.3 Linearisierung des Targeting Vektors zur Elektroporation

120 µg des Targeting Vektors wurden in 200 µl Gesamtvolumen mit 10 U NotI über Nacht linearisiert. 1 µl des Ansatzes wurde zur Kontrolle der Linearisierung auf ein 0,7 % Agarosegel aufgetragen. Nach Inaktivierung des Enzyms bei 65 °C für 20 Minuten wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.1.3.1) durchgeführt. Die Fällung der DNS (2.1.3.2) und die anschließende Trocknung wurde unter der Sterilbank durchgeführt. Die DNS wurde unter Erwärmen auf 50 °C in 100 µl sterilem PBS gelöst.

2.8.4.4 Elektroporation von Stammzellen

Bei Erreichen einer Konfluenz von 60-70 % in den 70 cm² Flaschen wurde die Elektroporation durchgeführt. Am Abend vor der Elektroporation wurden Feederzellen auf 10 Petrischalen ausgesät. Das Medium der 75 cm² Flasche wurde abgesaugt und die ES Zellen wurden zweimal mit 15 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 3 ml Trypsin/EDTA wurde für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde mit 7 ml ES Medium resuspendiert und in einem Röhrchen bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 10 ml PBS nochmals resuspendiert und zentrifugiert. Die ES Zellen wurden in 700 µl PBS resuspendiert und in eine Elektroporationsküvette mit 0,4 cm Elektrodenabstand (Peqlab) überführt. Mit einer Pipette wurden 100 µl des linearisierten Targeting Vektors mit der Zellsuspension gemischt. Die Elektroporation wurde mit dem GenePulser (Biorad) durchgeführt. Die Kapazität wurde auf 500 µF eingestellt, die Spannung auf 230 V. Nach der Elektroporation wurde die Küvette 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Zellen wurden dann in 9 ml ES Medium resuspendiert und jeweils 1 ml in die 10 Petrischalen

pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken verteilt. Die Schalen wurden bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert.

2.8.4.5 Selektion rekombinierter Stammzellen

24 Stunden nach der Elektroporation wurde mit der Selektion begonnen. Dem ES Medium wurde G-418 in einer Endkonzentration von 400 µg/ml zugesetzt. Weiterhin wurde das Medium täglich gewechselt. Waren viele tote Zellen zu sehen, wurde kurz mit 10 ml PBS gewaschen.

2.8.4.6 Isolation resistenter Klone

Als die ersten Klone mit bloßem Auge sichtbar waren, wurde mit der Isolation einzelner Kolonien begonnen. Es wurde eine ausreichende Anzahl 96 well-Platten mit Feederzellen vorbereitet (jeder Klon wurde auf zwei Platten gesplittet). Auf einer weiteren 96 well-Platte wurden pro Loch 30 µl PBS vorgelegt. Ein unter die Sterilbank gestelltes Mikroskop diente zur Suche und Kontrolle der Klone auf den Petrischalen. Die Klone wurden mit einer 20 µl Filterspitze umkreist, um den Feederzellverband zu lösen. Anschließend wurden die Klone mit der Pipette eingesaugt und ein Loch der 96 well-Platte mit dem vorgelegten PBS pipettiert. Nachdem alle brauchbaren Klone einer Petrischale isoliert waren, wurde das Medium abgesaugt und neues ES Selektionsmedium zugesetzt. Nach 96 Klonen bzw. nachdem alle 10 Petrischalen durchsucht worden waren, wurden auf jeden isolierten Klon 30 µl 2x Trypsin/EDTA pipettiert und die 96 well-Platte für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Klone wurden durch mehrmaliges Pipettieren resuspendiert. Mit dem Mikroskop wurde die Resuspension der Klone kontrolliert und wenn nötig nochmals durch Pipettieren vereinzelt. Pro Loch wurden 60 µl ES Selektionsmedium zugegeben und die Zellen wieder resuspendiert. Jeder Klon wurde auf zwei 96 well-Platten mit Feederzellen verteilt. Das Medium wurde täglich gewechselt und die Zellen auf ihr Wachstum hin kontrolliert.

2.8.4.7 Gefrierstocks

Bei etwa 60-70% Konfluenz (nach drei Tagen) wurde die erste Platte (Masterplatte) eingefroren. Die Klone wurden mit je 180 µl PBS gewaschen und mit je 30 µl 1x Trypsin/EDTA für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden je 180 µl Einfriermedium zugegeben und die Zellen gut resuspendiert. Die Platten wurden für 3 Stunden bei -20 °C eingefroren und dann bei -80 °C gelagert.

Die zweite Platte wurde bei ähnlicher Konfluenz wie oben beschrieben auf drei weitere mit Feederzellen vorbereitete Platten (zur Analyse) gesplittet. Bei völliger Konfluenz (nach ca. drei weiteren Tagen ohne Mediumwechsel, bis zur Gelbfärbung des Mediums) wurden die Platten mit PBS gewaschen und ohne Medium bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

2.8.4.8 Analyse der resistenten Klone

Die zur Analyse bestimmten Platten wurden aufgetaut und die Zellen über Nacht bei 55 °C lysiert (50 µl Lysepuffer pro Loch, 2.1.2.2). Damit die Lösung nicht verdunstet, wurden freie Löcher mit PBS gefüllt, die Platten abgeklebt und in einer feuchten Box inkubiert. Am nächsten Tag wurde in jedes Loch 100 µl eines eiskalten Gemisches aus 12 ml Ethanol und

180 µl 5 M Natriumchloridlösung pipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt (die gefällte DNS haftet am Plastik) und dreimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen für eine Stunde wurde die DNS entweder für PCR-Analysen über Nacht bei 37 °C in 30 µl gelöst oder für Southern Blots (2.1.8) direkt mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (2.1.4.1) über Nacht inkubiert. Die Enzymkonzentration pro Restriktionsansatz betrug 20-25 U/50 µl.

2.8.5 Zweites ES Zell Targeting

2.8.5.1 Auftauen und Kultivieren positiver Klone

Die Masterplatten mit den zur Transfektion ausgewählten Klonen wurden im Brutschrank aufgetaut. Die positiven Klone des ersten Targetings wurden mit der Pipette resuspendiert und jeweils in ein Loch einer mit Feederzellen vorbereiteten 24 well-Platte transferiert. Bei jeweils 60 % Konfluenz wurde der Klon auf die nächst größere Fläche passagiert (6 well-Platte, 25 cm² Flasche, 75 cm² Flasche). Beim Umsetzen in die 25 cm² Flasche wurden aus einer Hälfte der Zellsuspension zwei 1 ml Gefrierstocks in Kryoröhrchen hergestellt.

2.8.5.2 Transiente Transfektion der ES Zellen mit Cre-Plasmid

100 µg des Cre Rekombinase exprimierenden Plasmids pIC-Cre (Gu, Zou et al. 1993) wurden in nicht linearisiertem Zustand auf die unter 2.8.4.3 beschriebene Weise gereinigt und gefällt. Jeder Klon wurde mit 20 µg DNS elektroporiert (2.8.4.4). Im Gegensatz zum ersten Targeting wurden die transfizierten ES Zellen jedoch in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Petrischalen ausgesät. Pro Klon wurden insgesamt 6 Platten ausgesät mit 2 %, 5 %, zweimal 10 %, 20 % und dem Rest der ES Zellsuspension.

2.8.5.3 Negative Selektion von rekombinierten Stammzellen

48 Stunden nach der Transfektion wurde mit der Selektion begonnen. Dem Medium wurden 2 µM Ganciclovir zugesetzt. Weiterhin wurde das Medium täglich gewechselt. Waren viele tote Zellen zu sehen, wurde kurz mit 10 ml PBS gewaschen.

2.8.5.4 Isolation, Gefrierstocks und Analyse der rekombinierten Klone

Das weitere Vorgehen entsprach dem beim ersten Targeting (2.8.4.6-2.8.4.8), nach acht Tagen konnten die ersten Klone isoliert werden.

2.9 Erzeugung genetisch modifizierter Mäuse

Die hier beschriebene Prozedur wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München durchgeführt.

2.9.1 Verwendete Tiere

Alle Mäuse wurden auf konventionelle Weise ordnungsgemäß in klimatisierten Tierställen gehalten. Sie erhielten Wasser und Futter ad libitum. Zur Organentnahme wurden die Mäuse

durch zervikale Dislokation getötet. Die Verhaltensversuche in Zürich wurden nach schweizerischem Recht von den dortigen Behörden genehmigt. Die beiden für die Injektion benötigten Mausstämme C57/Bl6 und CD-1 wurden von Charles River (Niederlassung Sulzfeld) bezogen. Die vasktomierten CD-1-Männchen wurden in der französischen Niederlassung von Charles River operiert.

2.9.2 Vorbereitung der ausgewählten Klone

Die zur Injektion bestimmten Klone wurden aufgetaut und bis zum Erreichen der 6 well-Platte kultiviert (2.8.5.1). Jeder Klon wurde nun immer in jeweils 3 unterschiedlichen Konzentrationen auf eine neue 6 well-Platte passagiert (z.B. 1:5, 1:10 und 1:20), um am Tag der Injektion nicht zu dicht gewachsene Klone zur Verfügung zu haben. Zusätzlich wurden bei jeder Passage Gefrierstocks in Kryoröhrchen erstellt.

2.9.3 Gewinnung von Blastozysten

Über Nacht wurde jeweils ein C57/Bl6-Männchen mit 2 Weibchen des gleichen Stammes verpaart. Am nächsten Morgen wurden die Weibchen auf einen vaginalen Pfropf hin kontrolliert (2.8.3.1). Dies wurde als Tag 0,5 der Schwangerschaft festgelegt. An Tag 3,5 wurden die Weibchen durch zervikale Dislokation getötet, die Uteri isoliert und die Blastozysten herausgespült. Bis zur Injektion wurden sie in M2 Medium (Sigma) bei 37 °C 10 % CO₂ gelagert.

2.9.4 Erzeugung pseudoschwangerer Leihmütter

Die Feststellung der Pseudoschwangerschaft dient dazu, bei den Leihmüttern das richtige Stadium des weiblichen Zyklus zu bestimmen. Die CD-1 Leihmütter wurden mit den vasktomierten CD-1 Männchen verpaart und ebenfalls auf einen vaginalen Pfropf hin kontrolliert. Am Tag 2,5 der Pseudoschwangerschaft wurden den Tieren die injizierten Blastozysten implantiert.

2.9.5 Injektion der Stammzellen in die Blastozysten

Die Blastozysteninjektion wurde von Dr. Susanne Feil durchgeführt. Pro Blastozyste wurden ca. 10 Stammzellen injiziert. Nach der Injektion wurden die Blastozysten bis zur Retransplantation in M2 Medium bei 37 °C 10 % CO₂ inkubiert.

2.9.6 Reimplantation der Blastozysten

Die Leihmütter wurden mit einem Gemisch aus Ketamin (10 mg/ml) und Xylazin (2 mg/ml) narkotisiert (10-15 µl/g Mausgewicht). Auf einer Seite wurde der Bereich des Eierstocks und der Beginn des Uterus freigelegt. Unter dem Stereomikroskop wurde der Uterus mit einer Kanüle punktiert und ca. 10 bis 12 Blastozysten injiziert. Muskel und Haut wurden mit chirurgischem Nahtmaterial versorgt und die Maus bis zum Ende der Narkose warmgehalten.

2.9.7 Verpaarung der Chimären

Die aus den Schwangerschaften der Leihmütter entstandenen Tiere wurden auf ihre Fellfarbe hin untersucht. Da die verwendete Stammzelllinie männlich war, wurden nur chimäre Männchen mit C57/Bl6 Weibchen verpaart. Nachkommen dieser Männchen, deren Fell agouti (braun) war, wurden genotypisiert (2.1.6.2).

2.9.8 Mauszucht

Die Zucht hatte zwei Ziele: Zum einen sollten Tiere mit definiertem genetischem Hintergrund gezüchtet werden. Zum anderen sollten für kritische Versuche, wie z.B. den Verhaltensversuchen, auch WT Geschwister zur Verfügung stehen, um sicherzustellen, dass die Tiere unter gleichen Bedingungen aufgewachsen sind.

Die Stammzellen und damit auch die direkten Nachkommen der Chimären waren vom Stamm Sv129 (2.7). Durch Verpaarung dieser Tiere mit Sv129 WT wurde eine reine Sv129 Zucht erhalten. Um den HCN3-KO auf einen anderen genetischen Hintergrund zu züchten, hier C57/Bl6, müssen etwa 10 Generationen jeweils wiederum mit C57/Bl6 WT-Tieren verpaart werden (Markel, Shu et al. 1997).

2.10 Verhaltensversuche

Die Verhaltensversuche wurden am Institut für Neuroanatomie und Verhalten der Medizinischen Fakultät der Universität Zürich durchgeführt. Es wurden 18 Wildtyp- und 13 Knock-out-Mäuse beider Geschlechter untersucht. Alle waren zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns 6-7 Wochen alt. Sie wurden 2 Wochen vor Beginn der Experimente nach Zürich gebracht, um sie an den Tierstall und den umgekehrten Tag-Nacht-Rhythmus zu gewöhnen, da sie während ihrer aktiven Phase untersucht werden sollten. Zu Beginn des ersten Versuchs wurde jedes Tier in einen eigenen Käfig gesetzt und verblieb dort über die gesamte Dauer der fünf Experimente. Die Mäuse wurden jeweils 30 Minuten vor Beginn aus dem Tierstall in den Versuchsraum gebracht.

Die statistische Auswertung des Rotarod- und des Geruchsaversionstests wurde mit Origin (OriginLab) durchgeführt. Die anderen Versuche (Water maze, Open Field, Light-Dark Transition) wurden mit StatView durch PD Dr. D. Wolfer ausgewertet.

2.10.1 Morris Water maze

Das Water maze besteht aus einem Becken mit einem Durchmesser von 1,5 Metern. Es wird zirka 20 cm hoch mit 24-26 °C warmen Wasser gefüllt. Durch Zugabe von 1 l Milch nimmt es eine opake Färbung an. Eine Plattform wird in das Becken gestellt. Sie besteht aus einem weiß gestrichenen Gitter (12x12 cm). Die Plattform ist im Wasser 0,5-1 cm unter der Oberfläche verborgen. Die Wände um das Becken sind mit unterschiedlichen Symbolen markiert.

Der Versuch erstreckt sich über 5 Tage mit jeweils 6 einzelnen Durchgängen pro Tier. An den ersten 3 Versuchstagen befindet sich die Plattform immer an derselben Stelle, an den Tagen 4 und 5 wird sie an die gegenüberliegende Position versetzt.

Um die mögliche Bevorzugung einer Raumrichtung auszuschließen (z.B. größte Entfernung zum Experimentator, Gerüche usw.), wurden die Tiere zufällig in vier Gruppen unterteilt. Bei jeder Gruppe befand sich die Zielplattform in einem anderen der vier Quadranten.

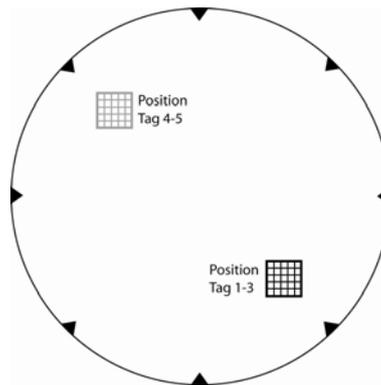


Abbildung 2-2 Water maze

Die Mäuse werden bei jedem Durchgang an einer anderen, mit schwarzen Dreiecken markierten Position ins Becken gesetzt.

Das Tier hat 2 Minuten Zeit, die verborgene Plattform zu finden. Dann ist der Durchgang beendet. Nach ca. zehn Sekunden auf der Plattform wird das Tier mit Hilfe eines an einem Stab befestigten Gitters aus dem Becken 'befreit'. Findet das Tier die Plattform in dieser Zeit nicht, wird es ebenfalls mit dem Gitter aus dem Becken genommen und zurück in den Käfig gesetzt.

Mit einer zentral über dem Becken montierten Videokamera und angeschlossenem Trackingsystem (Ethovision 2.2, Noldus) werden die Bewegungen der Tiere aufgezeichnet. Mit Hilfe von WinTrack, einer am Institut von PD Dr. D. Wolfer entwickelten Software, werden zahlreiche Parameter ausgewertet. Die wichtigsten darunter sind: Zeit/Weg bis zur Plattform, Zeit im Zielquadranten beim ersten Durchgang mit der versetzten Plattform, Thigmotaxis (Schwimmen entlang der Beckenwand), Kreisen und viele andere.

2.10.2 Open Field Test

An den Tagen des Experiments wurden die Tiere in den Versuchsraum gebracht und der Versuch etwa 30 Minuten später begonnen. Es kam dasselbe Becken wie beim Morris Water maze (Abbildung 2-3) zum Einsatz, jedoch ohne Wasser. Der Versuch erstreckt sich über 2 Tage. Jede Maus wird an jedem Tag einmal für zehn Minuten an derselben Stelle in das Becken und anschließend wieder zurück in den Käfig gesetzt. Das Becken wird nach jeder Maus gründlich mit Wasser und Ethanol gereinigt, um Geruchsspuren zu vermeiden.

Die Auswertung erfolgt analog zum Water maze Test (2.10.1). Unter anderem werden folgende Parameter ausgewertet: Zurückgelegter Weg, bevorzugte Zone (Wand, außen, innen), Aufrichten, Erforschen, Rotieren usw.



Abbildung 2-3 Open field test

Das verwendete Becken wird auch als Morris Water maze genutzt

2.10.3 Dark-Light-Transition Test

Jedes Tier wurde einmal getestet. Es wurde in den hell erleuchteten Teil (411 Lux) der Kammer (Abbildung 2-4) gesetzt und über fünf Minuten beobachtet. Dies geschah ebenfalls wieder elektronisch (2.10.1). War die Maus in der dunklen Box, maß das System die Zeit, in der sie nicht sichtbar war. Zusätzlich wurde manuell aufgezeichnet, wie häufig sich die Tiere an den durchsichtigen Plexiglasflächen des hellen Teils aufrichteten bzw. sich putzten.

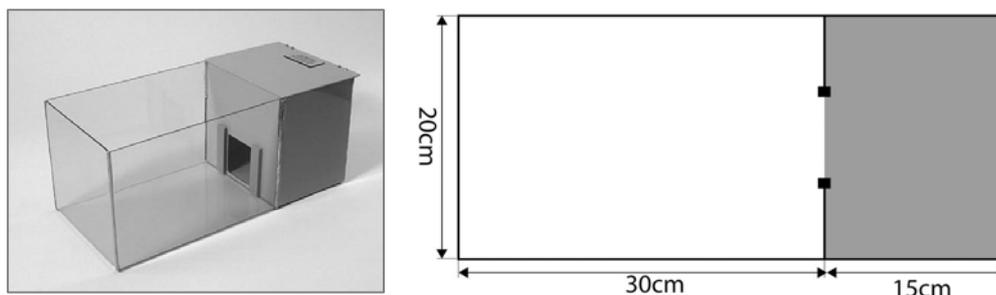


Abbildung 2-4 Light-Dark Transition test

Versuchsbox und Dimensionen

Folgende Parameter wurden bestimmt: Dauer bis zum Betreten der dunklen Box, Zeitanteil des Aufenthaltes im offenen Bereich, Zahl der Übergänge zwischen dunklem und hellem Kompartiment.

2.10.4 Rotarod

Verwendet wurde das Gerät Accelerating Rotarod 7650 (Ugo Basile, Biological Research Apparatus, Varese, Italien, Abbildung 2-5). Bei diesem Gerät kann die Geschwindigkeit konstant bleiben oder graduell erhöht werden. Gemessen wird die Zeit, bis die Tiere herunterfallen bzw. sich festklammern und sich um den Stab drehen.

Das verwendete Protokoll wurde von Nolan (Nolan, Malleret et al. 2003) adaptiert. Die Mäuse wurden über zwei Tage mit jeweils vier Durchgängen auf dem sich langsam von 4 bis 40 rpm beschleunigenden Stab trainiert. Die Zeit bis zum Herunterfallen bzw. bis zum Mitrotieren wurde notiert. Nach 5 Minuten wurde der Versuch abgebrochen.

Am dritten Tag wurden die Tiere mit konstanten Geschwindigkeiten in abnehmender Reihenfolge von ca. 40, 30, 20 und 10 rpm in jeweils drei Durchgängen für 2 Minuten getestet.

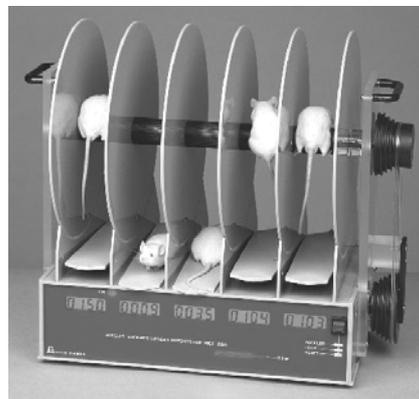


Abbildung 2-5 Rotarod

2.10.5 Geruchsaversionstest

Die Mäuse wurden einzeln gehalten, der Test fand in ihren eigenen Käfigen statt. 24 Stunden vor Beginn des Trainings wurden die Trinkflaschen entfernt. Über den Testzeitraum bekamen die Tiere nur zweimal am Tag im Abstand von vier Stunden für jeweils 20 Minuten zu Trinken. Als CS (konditionierter Stimulus, 3.6.5) wurde natürliches Zitronenaroma gewählt in einer Verdünnung von 1:10000. Der unkonditionierte Stimulus (Übelkeit) wurde durch eine Injektion von Lithiumchlorid (0,14 M in 0,9 % Kochsalzlösung mit einem Volumen von 2 % des Körpergewichts) ausgelöst. Als Trinklösung wurde 0,2 % Saccharinlösung gewählt. Die süße Lösung überdeckt den schwachen Zitronengeschmack. An den Trainingstagen (Tag 1-3) bekamen die Tiere jeweils 2 Fläschchen (unten abgeschnittene 15 ml Falcon-Röhrchen mit einer Öffnung von ca. 2-3 mm) mit Saccharinlösung. Die Röhrchen wurden vorher und nachher gewogen und die getrunkene Menge bestimmt. Am Tag der Konditionierung bekamen die Tiere morgens nur eine Flasche, die Saccharinlösung mit dem Zitronenaroma enthielt. Eine Stunde später wurde Lithiumchlorid injiziert. Nachmittags und am Tag 5 bekamen die Tiere jeweils wieder zwei Flaschen mit Saccharinlösung ohne CS. An den Tagen 6-8 wurde die Konditionierung getestet, jeweils vormittags und nachmittags. Die Tiere

bekamen zuerst die Flasche mit dem CS in den Käfig, sobald sie daran rochen oder tranken, wurde die Flasche ohne CS hinzustellen. Die Positionen waren zufällig. Die Flaschen wurden wieder vorher und nachher gewogen und die getrunzene Menge bestimmt. An den Tagen 7 bzw. 8 wurde die Konzentration des CS jeweils um den Faktor 10 reduziert (1:10⁵ bzw. 1:10⁶).

2.11 Kardiologische Experimente

2.11.1 EKG

Die Implantation der EKG-Transponder und die Aufzeichnung der EKGs wurde von Dr. Juliane Stieber am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München durchgeführt. Transpondersystem und Aufzeichnungssoftware (Dataquest A.R.T 3.0) wurden von der Firma DSI bezogen. Die Statistik wurde mit Origin (Origin Labs) erstellt. Dazu wurden die Rohdaten importiert und nach Filterung („5 points adjacent averaging“) die Peaks mit der „Find Peaks“ Funktion detektiert. Die Funktion wurde an die einzelnen EKGs angepasst, um möglichst viele Peaks automatisch zu erkennen. Peaks, die von der Routine nicht gefunden wurden, wurden manuell während der Kontrolle gesetzt.

Die Tiere waren littermatched und mit einer Ausnahme 2-6 Monate alt. Vier Wochen nach der Implantation der Transponder (TA10EA-F20) wurde mit den EKG Aufzeichnungen begonnen. Die Software zeichnete zusätzlich die Aktivität der Tiere (Bewegungen des Tieres im Käfig) auf.

Nach einer grundlegenden EKG-Aufzeichnung über einen Zeitraum von einer Woche (alle 30 Minuten für 20 Sekunden) wurden auch Pharmaka getestet. Um einen Effekt der Injektion selbst ausschließen zu können, wurden die Tiere vor Beginn der Versuche über drei Tage an die Injektion gewöhnt. Sie bekamen dreimal nur NaCl injiziert. An den darauf folgenden Tagen wurde dann Adrenalin in unterschiedlichen Dosen verabreicht.

2.11.2 Isoliertes Sinusknoten-Vorhof Präparat

<u>Krebs-Henseleit-Lösung (modifiziert)</u>	
NaCl	118 mM
KCl	5 mM
MgSO ₄	1 mM
KH ₂ PO ₄	1 mM
NaHCO ₃	25 mM
Glucose	10 mM
CaCl ₂	2 mM
Ascorbinsäure	0,3 mM

Der pH-Wert wurde unmittelbar vor der Verwendung auf pH 7,4 eingestellt. Die Krebs-Henseleit-Lösung wurde zuvor mindestens 10 Minuten mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) zur Äquilibration begast.

Versuchsdurchführung

Bei der Messung eines KO-Präparats wurde jeweils parallel ein WT-Geschwistertier des gleichen Geschlechts gemessen. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet. Die Herzen wurden freipräpariert, wobei darauf geachtet wurde, störendes Gewebe wie Thymus und Fett vollständig zu entfernen und gleichzeitig weder den Sinusknoten noch die Vorhöfe zu verletzen. Das Herz wurde in einer mit Krebs-Henseleit-Lösung gefüllten Petrischale fixiert. Mit chirurgischem Nahtmaterial (Stärke 4 oder 5) wurden 2 Schlaufen durch das Gewebe des rechten Vorhofs gelegt. Anschließend wurde der Vorhof mit dem Sinusknoten vom restlichen Herz getrennt und in das vorbereitete Organbad (Krebs-Henseleit-Lösung, 37 °C, Carbogenbegasung) gehängt. Die Präparate wurden mit ca. 3-4 cN vorgedehnt, um eine maximale Kontraktion zu erreichen. Die Lösung wurde dreimal alle 15 Minuten ausgetauscht. Nach 60 Minuten wurde mit der Messung begonnen. Die Kontraktionen wurden durch Kraftaufnehmer („isometric force transducer F-30“, Hugo Sache Elektronik - Harvard Apparatus) und einen angeschlossenen Computer von einer Software (HSE Acad, Hugo Sache Elektronik - Harvard Apparatus) aufgenommen. Ein Abschnitt von fünf Minuten (60-65 Minuten nach dem Aufhängen) wurde in Origin importiert, mit einem low-pass Filter (50 Hertz) gefiltert und manuell von Artefakten befreit. Die Abstände zwischen den Peaks wurden vermessen und daraus die Herzfrequenz und die Frequenzvariabilität (Standardabweichung) bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1 Konstruktion des Vektors zur homologen Rekombination

Das Ziel der Strategie war, mit einem Vektor sowohl einen konstitutiven als auch einen konditionalen KO zu generieren. Zur Deletion wurde das Exon 2 ausgewählt, welches für die Transmembransegmente 1-4 kodiert (1.1). Das Segment 4 enthält den Spannungssensor. Zusätzlich führt Spleißen von Exon 1 auf Exon 3 zu einer Verschiebung des Leserahmens, der noch im Exon 3 zu einem Stopcodon führt und damit die Translation beendet. Um den konditionalen KO zu ermöglichen, musste das Exon 2 von loxP-Seiten flankiert werden und die Selektionskassette im Intron 1 oder 2 liegen.

3.1.1 Restriktionskarte und Sequenzierung des HCN3 Lokus

Zum Zeitpunkt der Erstellung des HCN3 Targeting Vektors war die Sequenz des Mausgenoms noch nicht veröffentlicht. Da eine genaue Lokalisation der Exons und der Restriktionsstellen nötig war, wurden die Introns sequenziert. Dies gelang für die relativ kurzen Bereiche zwischen den Exons 2 und 8, jedoch nicht für das ca. 7 kb große Intron 1. Aus dem BAC-Klon, der den HCN3 Lokus enthielt, wurde eine Long Template PCR (2.1.6.3) von Exon 1 bis Exon 2 durchgeführt (Primer E1bF und E2R). Sowohl das erhaltene PCR-Fragment als auch der gesamte BAC-Klon wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen (2.1.4.1) verdaut. Die erhaltenen DNS-Fragmente wurden per Southern Blot (2.1.8) auf eine Membran übertragen und mit Sonden für Exon 1, 2 oder 8 hybridisiert. Aus dem erhaltenen Bandenmuster konnte die Position der Restriktionsstellen im Intron und vor Exon 1 bzw. nach Exon 8 bestimmt werden. In Kombination mit den Ergebnissen der Sequenzierungen ergab sich die folgende Karte des HCN3 Lokus:

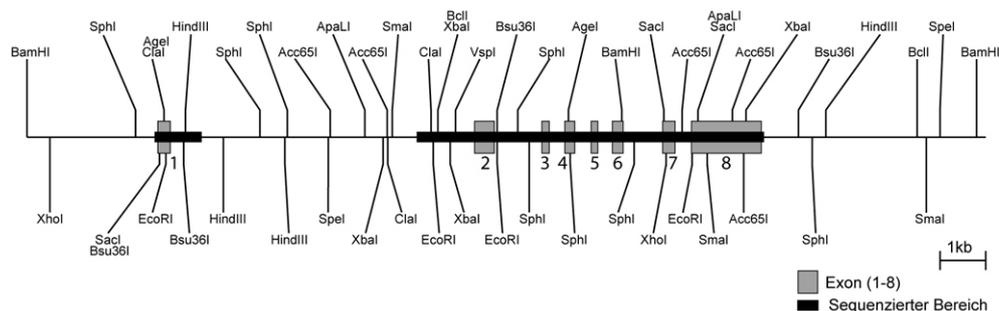


Abbildung 3-1 Restriktionskarte

Die Exons sind grau, die sequenzierten Bereiche sind schwarz dargestellt. Die Position der Restriktionsstellen wurde mit der nachträglich veröffentlichten Maussequenz verglichen.

3.1.2 Konstruktion des Targeting Vektors

Der Targeting Vektor wurde schrittweise aus vier Teilen zusammengesetzt (Abbildung 3-2). Zunächst wurden die beiden homologen Arme aus dem BAC-Klon entnommen und subkloniert. Für den 5'-homologen Arm wurde dies mit den Schnittstellen Bsu36I und VspI durchgeführt. Das Fragment wurde in einen Linker kloniert, der 5' eine NotI-Schnittstelle und 3' eine AscI-Schnittstelle trägt. Der 3'-homologe Arm wurde mit den Enzymen Bsu36I und Acc65I aus dem BAC-Klon entnommen und in pBSloxPneoTkloxP kloniert, indem 3' der neo-tk Kasette mit Hilfe eines Linkers eine zusätzliche Bsu36I Schnittstelle eingefügt wurde. Über den Bereich des Exons 2 wurde eine Long Template PCR durchgeführt. Der 5'-Primer (RM7F) enthielt zusätzlich zur homologen Sequenz eine NotI-, eine AscI-Schnittstelle und die 34 Basen der loxP-Sequenz. Der 3'-Primer (RM8R) besaß die zusätzlichen Schnittstellen ApaLI und BamHI. Über NotI und BamHI wurde das PCR Stück in den Vektor mit der neo-tk Kasette und dem 3'-homologen Arm eingesetzt. Der letzte Schritt war die Klonierung des 5' homologen Arms in diesen Vektor über NotI und AscI. Der komplette durch PCR erstellte Bereich und sämtliche durch die Klonierungen entstandenen Übergänge wurden sequenziert, um mögliche zufällige Mutationen auszuschließen.

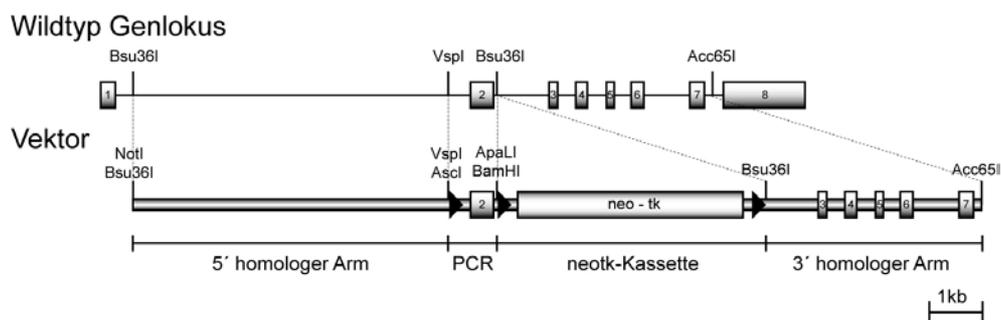


Abbildung 3-2 Aufbau des Targeting Vektors

3.1.3 Erstellung der Gensonden zum Nachweis der Rekombination des Genoms

Zum Screening der ES Zellen und später der Mäuse wurden Sonden erstellt, die sich sowohl 5' als auch 3' außerhalb der Sequenz des Targeting Vektors befanden. Nur auf diese Weise kann ein homolog integrierter Vektor von einem zufällig integrierten unterschieden werden. Beide Sonden wurden mit einer PCR erstellt.

Zwei weitere Sonden wurden verwendet, um zusätzliche zufällige Integrationen auszuschließen. Die Sonde N liegt in der neo-tk Kasette und wurde durch Restriktion von pBSloxPneoTkloxP gewonnen. Die Sonde 2 liegt auf dem Exon 2 und wurde durch präparative PCR erstellt (Tabelle 3.1-1).

Alle Sonden wurden über ein PAGE-Gel (2.1.5.2) und anschließende Elektroelution (2.1.3.3) gereinigt.

Tabelle 3.1-1 Sonden zum Screening der ES Zellen

	Position	Primer / Enzyme	Größe
Sonde V	5' vom Vektor	E1bF und RM2R	223 bp
Sonde H	3' vom Vektor	RM1F und E8R	256 bp
Sonde N	neo-tk Kasette	HindIII und AgeI	148 bp
Sonde 2	Exon 2	E2F und E2R	417 bp

3.2 Herstellung eines polyklonalen anti-HCN3-Antikörpers

Zur Detektion des HCN3-Proteins ist zurzeit kein kommerzieller Antikörper erhältlich. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit ein eigener Antikörper hergestellt. Dazu wurden zunächst Antigenkonstrukte kloniert und auf ihre Proteinexpression getestet. Anschließend wurde ein Antigen präparativ exprimiert und aufgereinigt. Dieses wurde zur Immunisierung von Kaninchen verwendet.

3.2.1 Antigen

Ausgewählt wurden N- und C-terminale Teile des HCN3-Proteins (Abbildung 1-3), deren Aminosäuresequenzen keine Homologie zu HCN1, 2 und 4 aufweisen. Zusätzlich wurden die verwendeten Sequenzen mit Proteindatenbanken verglichen, um mögliche Homologien zu anderen Proteinen auszuschließen.

4 Antigenkonstrukte wurden erstellt:

Konstrukt I: AA 552 – 779, der gesamte intrazelluläre C-Terminus nach der Zyklonukleotidbindungsdomäne

Konstrukt II: AA 552 – 641, der 5' Anteil des Konstruktes I

Konstrukt III: AA 642 – 779, der 3' Anteil des Konstruktes I

Konstrukt IV: AA 6 – 53, der intrazelluläre N-Terminus vor Beginn der ersten Transmembrandomäne.

3.2.1.1 Klonierung der Konstrukte

Die Antigenkonstrukte I – III wurden mit Hilfe von PCR und Primern erzeugt, die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme BamHI (Forward-Primer, 5'-Ende) und HindIII (Reverse-Primer, 3'-Ende) enthielten:

Tabelle 3.2-1 Verwendete Primer zur Erstellung der Konstrukte und deren Größen

	Forward-Primer 5'-Ende	Reverse-Primer 3'-Ende	Basenpaare	Aminosäuren
Konstrukt I	RM18F	RM19R	687	229
Konstrukt II	RM18F	RM20R	267	89
Konstrukt III	RM21F	RM19R	420	140

Die PCR erfolgte mit Hilfe der fehlerkorrigierenden Pfu-Polymerase (2.1.6.1). Die Konstrukte wurden in den mit BamHI und HindIII aufgeschnittenen Vektor pQE-30 des QIAexpress-Kits ligiert.

Für das Antigenkonstrukt IV (147 Basenpaare, 49 Aminosäuren) dienten in der Sequenz bereits enthaltene Restriktionsstellen für die Restriktionsenzyme EagI (5'-Ende) und PstI (3'-Ende) zur Präparation des N-terminalen Konstruktes. Die Ligation in den Expressionsvektor pQE-30 erfolgte nach vorheriger Insertion eines Linkers, der die Schnittstelle für EagI „in frame“ an der Position von BamHI trägt. Die PstI Schnittstelle war in der MCS bereits vorhanden.

Die nach Amplifikation in E.coli und anschließender alkalischer Lyse erhaltenen Plasmide wurden mit einem geeigneten Restriktionsenzym auf richtige Ligation überprüft (PstI für die Konstrukte I und II, XmaI für das Konstrukt III und Bsu36I für das Konstrukt IV). Korrekte Klone wurden mit den auf dem Expressionsvektor liegenden Primern RM15F und RM25R sequenziert, um den richtigen Leserahmen und die Sequenz zu verifizieren.

3.2.1.2 Expression der Konstrukte und präparative Aufreinigung

Alle vier Konstrukte wurden auf ihre Expression hin getestet. Die Bakterienlysate wurden auf ein SDS-PAGE aufgetragen (2.3.4) und mit Coomassie gefärbt. Nur das Konstrukt I zeigte nach der Aufreinigung des Bakterienlysats mit Nickel/NTA-Agarose eine Bande in der erwarteten Größe von 29 kD (Abbildung 3-3 A).

Die drei kleineren zusätzlichen Banden waren durch Degradation zu erklären. Ein Hinweis dafür war der Western Blot mit dem anti-His-Tag-Antikörper. Auch hier waren die kleineren Banden sichtbar (Abbildung 3-3 B). Sie enthalten ebenfalls das His-Tag. Zudem zeigte sich, dass die Degradation in die kleineren Fragmente bereits während der Zellyse (L) eintrat. Bei der Expression entstand lediglich ein etwa 3 kD kleineres Fragment (IC).

Vor der präparativen Expression des Antigens wurden die Bedingungen während der Lyse mehrmals verändert, um möglichst wenig degradiertes Protein zu erhalten. Abbildung 3-3 C zeigt das präparativ aufgereinigte Antigen (E2). Der Anteil der Proteinfragmente unterhalb 10 kD wurde erheblich reduziert (2.4.1).

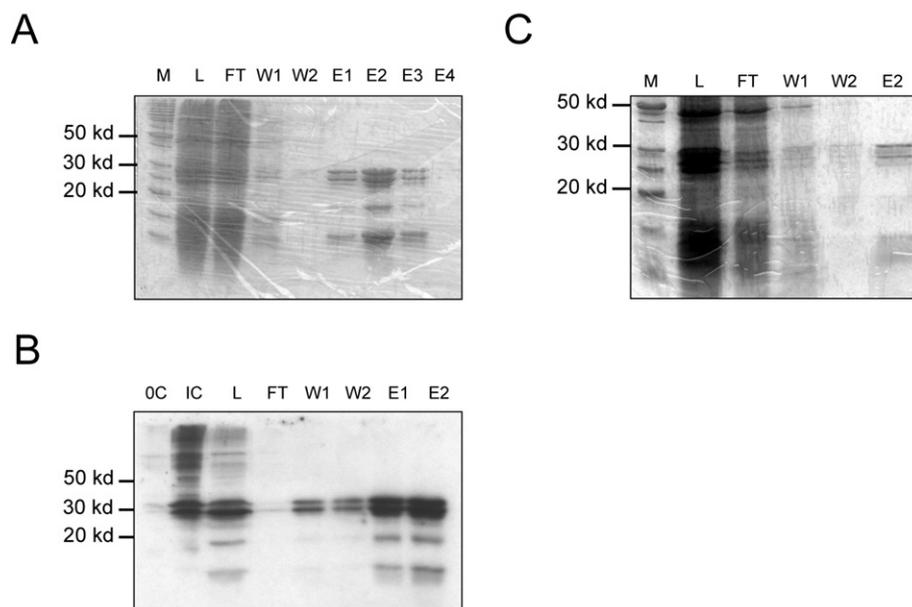


Abbildung 3-3 Expression des Antigenkonstrukts I

(A) Coomassie gefärbtes SDS-PAGE Gel. M Marker, L Bakterienlysate, FT Flow-through, W1/2 Waschschrirte, E1-4 Elutionsschrirte. (B) Western Blot mit anti-RGS-His-Antikörper. (C) SDS-PAGE zur Kontrolle der präparativen Expression des Antigens, 0C Kontrolle bei Induktion, IC Kontrolle nach 5 Stunden Induktion

Mit Hilfe der Bradford Methode (2.3.3) konnte eine Menge von ca. 2,7 mg für das aufgereinigte Antigen ermittelt werden. Das Protein wurde gefriergetrocknet und von der Firma Gramsch Laboratories zur Immunisierung zweier Kaninchen verwendet.

Zwei weitere Antigenpräparationen wurden zur Herstellung der Immunoaffinitätssäule (2.4.4) durchgeführt. Hier wurden insgesamt ca. 9 mg Protein hergestellt.

3.2.2 Antikörper

3.2.2.1 Test der erhaltenen Antisera

Von jedem der beiden immunisierten Kaninchen wurde im Wochenabstand Blut abgenommen. In der vierten Woche wurden die Tiere ausgeblutet. Die unterschiedlichen Sera wurden im Western Blot auf ihre Spezifität getestet.

Die Sera wurden in einer Konzentration von 1:5000 getestet. Zunächst wurden die jeweils ersten Sera der beiden Tiere verwendet (Abbildung 3-4 A). Der verwendete Marker (Benchmark Protein Ladder, Invitrogen) bestand aus rekombinanten Proteinen, die ebenfalls über ein His-Tag aufgereinigt wurden. Das Serum #9495 enthielt offensichtlich spezifische Antikörper gegen das Tag. Insgesamt waren viele unspezifische Banden zu erkennen, besonders ungünstig war diejenige auf der Höhe der erwarteten HCN3 Bande bei ca. 90 kD.

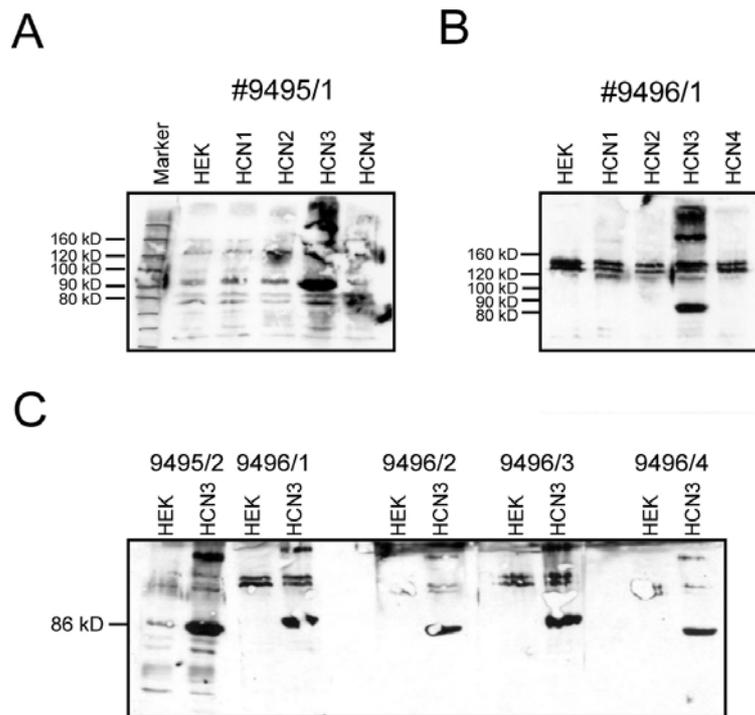


Abbildung 3-4 Analyse der erhaltenen Antisera

Western Blot mit den ersten Sera beider Kaninchen. Aufgetragen sind Membranpräparationen von untransfizierten (HEK) bzw. mit den vier HCN Isoformen transfizierten HEK293 Zellen. (A) Serum #9495 enthält u.a. Antikörper gegen das His-Tag, daher ist der Marker zu sehen. (B) Serum #9496 (C) In fünf Western Blots wurden die vier Sera des Kaninchens #9496 mit dem Serum von #9495 verglichen. Die Bande bei ~86 kD entspricht der berechneten Größe von HCN3.

Das Antiserum #9496/1 zeigte ein geringeres unspezifisches Signal, allerdings eine starke Doppelbande bei ca. 140 kD (Abbildung 3-4 B). Da sich die Sera eines Tieres über die Zeit in ihrer Spezifität ändern können, wurden weitere getestet (Abbildung 3-4 C). Der Vergleich der vier Sera des Tieres #9496 zeigte hier jedoch keine großen Veränderungen.

3.2.2.2 Test der Antikörper

Zur Verbesserung der Spezifität wurden die anti-HCN3-Antikörper aus den Sera durch Immunoaffinitätschromatographie aufgereinigt (2.4.4) und im Western Blot, auf HEK-Zellen und im Gewebe getestet.

Western Blot

In den folgenden Western Blots wurde der Antikörper aus dem Serum #9496/1 mit dem Antikörper aus dem Serum #9495/1 (jeweils in der Konzentration 1:5000) verglichen.

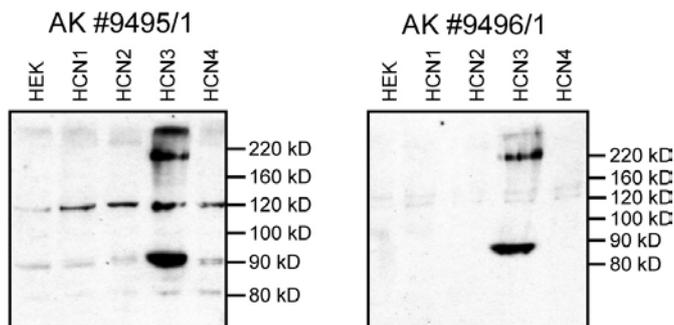


Abbildung 3-5 Vergleich der aus den Sera #9495 und #9496 aufgereinigten Antikörper

Der Antikörper #9495/1 zeigte eine unspezifische Bande auf der Höhe von HCN3 und eine zusätzliche starke Nebenbande bei 120 kD.

Durch die Aufreinigung wurde beim Antikörper #9496 das unspezifische Signal (Doppelbande zwischen 120 kD und 160 kD) wesentlich reduziert. Die Banden bei ca. 220 kD und darüber erschienen bei beiden Antikörpern und sind vermutlich aggregierte HCN3 Untereinheiten, da sie nur in der HCN3 Membranpräparation vorkommen.

Immuncytochemie mit HEK-Zellen

Der anti-HCN3-Antikörper wurde auch direkt mit den HCN3 exprimierenden HEK-Zellen getestet. Als Kontrolle wurden hier nur untransfizierte HEK-Zellen verwendet, da die unspezifischen Banden dem Western Blot zufolge bei allen HCN-Isoformen und den untransfizierten Zellen die gleichen waren.

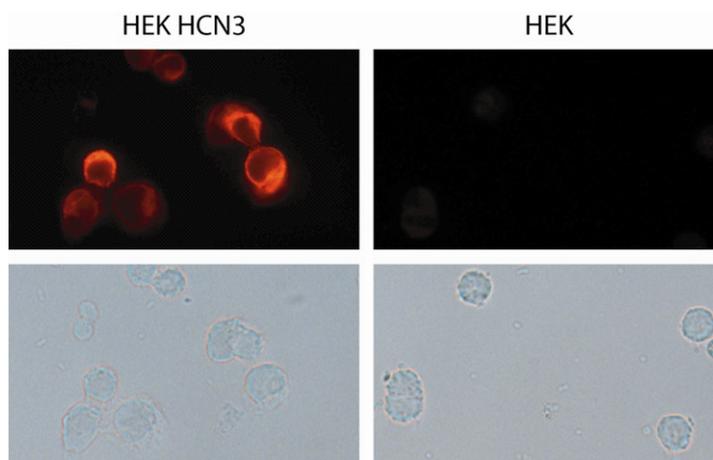


Abbildung 3-6 Immuncytochemischer Test des anti-HCN3-Antikörpers #9496

Im oberen Teil ist das Fluoreszenzsignal des detektierten anti-HCN3-Antikörpers, im unteren eine Durchlichtaufnahme abgebildet.

Der anti-HCN3-Antikörper wurde auch auf Gewebeschnitten von WT- und KO-Mäusen getestet. Die Ergebnisse sind weiter unten gezeigt (3.5.2).

3.3 ES-Zell Targeting

Die Erzeugung sowohl der HCN3-KO-Maus als auch der geflochtenen HCN3-Maus erfolgte durch „gene targeting“. Dieser Begriff bezeichnet den Vorgang, bei dem die mutierte DNS eines Gens in Stammzellen eingeschleust und damit das entsprechende Gen zielgerichtet mit Hilfe der homologen Rekombination verändert wird. Höchste Priorität hat die Erhaltung der Pluripotenz der kultivierten Stammzellen. Eine etwaige Differenzierung hätte zur Folge, dass keine Tiere generiert werden können. Die hierfür ergriffenen Maßnahmen sind unter 2.7 beschrieben.

3.3.1 Erstes Targeting

Die verwendeten Stammzellen befanden sich beim Auftauen in der 15. Passage. Nach drei Tagen und einer weiteren Passage waren die Stammzellkolonien ausreichend expandiert, um mit dem HCN3 Targeting Vektor elektroporiert zu werden (2.8.4.4). Hierfür wurden 100 µg des mit NotI linearisierten Vektors verwendet (2.8.4.3). Die auf zehn Petrischalen ausgesäten ES Zellen wurden nach 24 Stunden mit G-418-Selektionsmedium inkubiert. Nach weiteren fünf Tagen mit täglichem Wechsel des Selektionsmediums konnte mit der Isolation der einzeln gewachsenen Klone begonnen werden (2.8.4.6). Isoliert wurden nur Klone, die unter dem Mikroskop klar umrandet waren (Abbildung 3-7). Klone mit ausgefransten Rändern wurden entfernt, damit sie die Platten nicht überwachsen können. Im Verlauf von sieben Tagen wurden insgesamt 642 Klone auf 96 well-Platten vereinzelt. Danach waren keine guten Klone mehr zu erkennen. Die Masterplatten wurden bei einer Konfluenz der ES Zellen von 60-70 % bei -80 °C gelagert. Die drei Replikplatten wurden bis zur Konfluenz der Stammzellen kultiviert. Die Zellen wurden lysiert (2.8.4.8) und die erhaltene DNS durch Southern Blots und PCR analysiert.

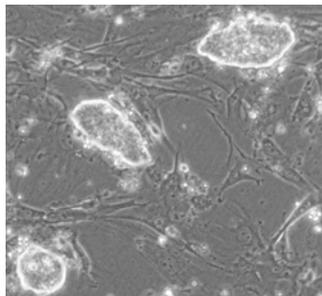


Abbildung 3-7 ES Zell Klone auf Feederzellen

3.3.1.1 Southern Blots zum Nachweis der Rekombination

Das primäre Screening des ersten Targetings wurde mit BamHI als Restriktionsenzym und der Sonde V (Abbildung 3-8 A) mit insgesamt 384 Klonen durchgeführt (vier 96 well-Platten). Analysiert wurden die Platten 1 (erster Tag der Isolation), 3, 4 und 6 (dritter, vierter und sechster Tag). Die einzelnen Klone jeder Platte wurden von 1 bis 96 durchnummeriert. Daraus ergab sich auch die Bezeichnung, z.B. Klon 6/93.

3.3.1.2 Analyse mit der 5'-Sonde (Sonde V)

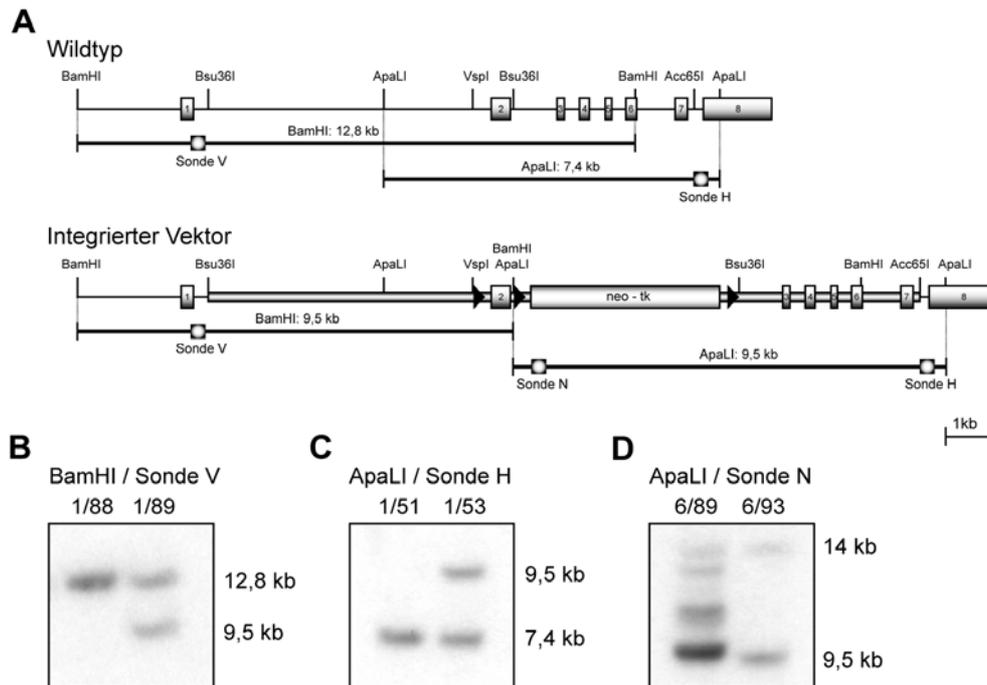


Abbildung 3-8 Erstes Targeting

(A) Lage der verwendeten Sonden und Größe der erwarteten Banden im Southern Blot. (B-D) beispielhafte Southern Blots mit jeweils einem negativen und einem positiven Klon. (B) primäres Screening mit BamHI und der Sonde V, die WT Bande liegt bei 12,8 kb, die Rekombination des einen Allels wird durch die zusätzliche Bande bei 9,5 kb gezeigt. (C) Sekundäres Screening der positiven Klone aus dem primären Screening mit ApaLI und der Sonde H, die WT Bande ist bei 7,4 kb, bei positiven Klonen findet sich eine zusätzliche Bande bei 9,5 kb. (D) Screening der positiven Klone aus dem ersten Targeting auf zusätzliche zufällige Integranden (z.B. 6/89) mit ApaLI und der Sonde N, die Bande bei 14 kb stammt von der Feederzell-DNS.

Für die Southern Blots des primären Screenings wurden große Gele verwendet, auf denen in jeweils zwei Reihen 23 bzw. 26 Klone aufgetragen werden konnten. Mit zwei Gelen konnte auf diese Weise eine 96 well-Platte im Ganzen analysiert werden. Jeweils 23 bzw. 26 Klone wurden mit $5 \cdot 10^6$ cpm/ml Sonde hybridisiert (2.1.8.2-2.1.8.4). Die Membranen wurden für 2 Stunden auf eine Phosphoimager Platte aufgelegt und anschließend für etwa sieben Tage auf einen Film.

Da die homologe Rekombination nur ein Allel betrifft und somit jeder rekombinierte Klon auch ein Wildtyp Allel trägt, wurde im primären Screening eine Doppelbande von 12,8 kb (WT) und 9,5 kb (Integrand) erwartet (Abbildung 3-8 A). Auf dem beispielhaft gezeigten Blot (Abbildung 3-8 B) ist ein negativer Klon mit einer einzigen Bande bei 12,8 kb und ein positiver Klon mit der entsprechenden Doppelbande gezeigt. Diese wurde bei insgesamt 10 der 384 analysierten Klone gefunden. Die positiven Klone waren 1/53, 1/67, 1/77, 1/79, 1/89, 3/27, 3/59, 3/65, 3/66 und 6/93.

3.3.1.3 Kontrolle der ersten loxP-Sequenz

Mit Hilfe der Southern Blots konnte nicht festgestellt werden, ob die erste loxP-Sequenz vor dem Exon 2 integriert wurde. Es wäre auch möglich, dass die Rekombination nur das Exon 2, die neo-tk Kasette und den 3' homologen Arm umfasst. Der Unterschied von 41 Basenpaaren ist im Southern Blot nicht zu detektieren. Um solche Klone zu erkennen, wurde eine PCR über den Bereich durchgeführt, der beim rekombinierten Allel die loxP-Sequenz enthält (Abbildung 3-9). Da die Primer RM15F und RM10R auf der Wildtyp Sequenz liegen, erhält man bei Vorhandensein der loxP eine Doppelbande bei 221 bp (WT-Allel) und 262 bp (rekombiniertes Allel). Bis auf den Klon 1/53 war die loxP-Sequenz bei allen Klonen nachzuweisen.

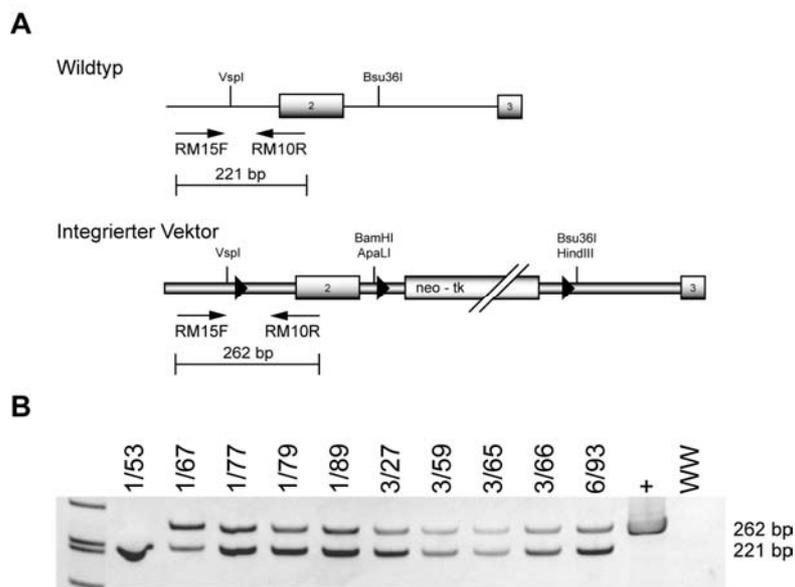


Abbildung 3-9 PCR zum Nachweis der 1. loxP-Sequenz im rekombinierten Allel

(A) Lage der Primer RM15F und RM10R. Durch die Integration der loxP-Sequenz wird das DNS-Fragment um 41 Basenpaare größer. (B) PAGE-Gel mit den PCR Produkten der einzelnen Klone. +: Positivkontrolle Targeting Vektor, WW: Wasserwert.

3.3.1.4 Analyse mit der 3'-Sonde (Sonde H)

Von der zweiten Replikaplatte wurden die positiven Klone des ersten Screenings und drei zusätzliche negative (1/51, 3/58 und 6/89) mit ApaLI verdaut und geblottet. Die Membranen wurden mit der Sonde H hybridisiert. Klone, die auf der 3' Seite richtig rekombiniert sind, haben neben der WT Bande bei 7,4 kb eine weitere bei 9,5 kb (Abbildung 3-8 C). Dies zeigten noch 8 weitere Klone: 1/53, 1/77, 1/89, 3/27, 3/59, 3/65, 3/66 und 6/93. Bei den Klonen 1/67 und 1/79 war die DNS-Menge so gering, dass sie auf dem Gel keine DNS-Spur zeigten und aus diesem Grund nicht analysiert werden konnten.

3.3.1.5 Analyse mit der neo-Sonde (Sonde N)

Zur Kontrolle, ob nicht noch weitere zufällige Integranden im Genom vorhanden waren, die andere Gene zerstören könnten, wurde der Blot der 3'-Sonde mit der Sonde N rehybridisiert

(2.1.8.5). Bei Vorhandensein weiterer Integranden erschienen neben der erwarteten Bande bei 9,5 kb (das gleiche DNS-Fragment wie bei der Sonde H) noch zusätzliche (Abbildung 3-8 D). Hier zeigten sich bei jedem Klon mindestens zwei Banden, was darauf zurückzuführen war, dass die auch auf den Replikaplatten verwendeten Feederzellen ebenfalls die Neomycinresistenz trugen und die Sonde N auch hier hybridisieren konnte. Dies wurde durch einen zusätzlichen Southern Blot nachgewiesen (nicht gezeigt). Alle Klone, die für die Sonden V und H positiv waren, zeigten auch keine zusätzlichen Banden.

3.3.1.6 Sequenzierung

Als letzter Test vor dem zweiten Targeting wurden die drei loxP Stellen aller positiven Klone per PCR amplifiziert (Abbildung 3-12 A - Integrand), die Banden aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert und sequenziert. Bei allen bisher positiven Klonen (1/77, 1/89, 3/27, 3/59, 3/65, 3/66 und 6/93) waren die Sequenzen korrekt.

3.3.2 Zweites Targeting

Für das zweite Targeting, bei dem die Selektionskassette entfernt wurde, wurden drei der sieben Primärklone ausgewählt, 1/77, 1/89 und 6/93. Die Masterplatten 1 und 6 wurden aufgetaut und die drei Klone auf einer 24 well-Platte ausgesät. Nach Passage auf eine 6 well-Platte und danach in 25 cm² Flaschen wurden die ES Zellen der Primärklone 1/89 und 6/93 mit dem Cre exprimierenden Plasmid transient transfiziert (2.8.5.1-2.8.5.2). Der Klon 1/77 wurde nicht verwendet, da viele tote Zellen im Medium zu sehen waren. Nach 48 Stunden begann die negative Selektion. ES Zellklone, bei denen durch die Rekombination die gefloxe neo-tk Kassette entfernt worden war, überlebten, während die anderen durch die Aktivierung des Nukleosidanalogons Ganciclovir durch die Thymidinkinase der Selektionskassette abstarben (2.8.5.3). Nach acht Tagen waren die einzelnen Klone ausreichend groß, um isoliert zu werden. Die Klone wurden wieder einzeln auf jeweils zwei 96 well-Platten transferiert und die erste Platte als Masterplatte bei -80 °C gelagert. Die zweite Platte wurde nochmals auf drei weitere Platten gesplittet. Diese wurden bis zur Konfluenz inkubiert und anschließend lysiert (2.8.5.4). Die Isolation erstreckte sich über drei Tage. Vom Primärklon 1/89 wurden 122 Klone, vom Primärklon 6/93 47 Klone isoliert.

Durch die Rekombination kann es theoretisch zu drei möglichen Ereignissen kommen. Im ersten Fall kann durch Rekombination der ersten beiden loxP-Seiten nur noch die Selektionskassette übrig bleiben. Solche Klone werden jedoch durch die negative Selektion mit Ganciclovir unterdrückt. Im zweiten Fall kann nur die Selektionskassette durch Rekombination der zweiten mit der dritten loxP-Seite entfernt werden, man erhält einen konditionalen KO-Klon. Die dritte Möglichkeit ist die Exzision des Exons 2 und der neo-tk Kassette durch Rekombination der ersten mit der dritten loxP-Seite. Dies ergibt einen KO Klon (Abbildung 3-10).

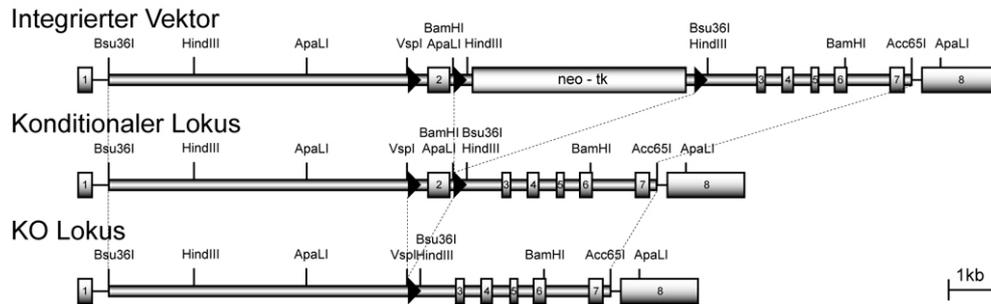


Abbildung 3-10 Rekombination des Integranden durch Cre führt zum konditionalen oder zum totalen KO-Allel

3.3.2.1 Southern Blots zum Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination

Das primäre Screening der rekombinierten Klone wurde mit dem Restriktionsenzym ApaLI und der Sonde H durchgeführt. Die Klone wurden wie folgt bezeichnet: Ursprungsklon Platte/Nummer (z.B. 1/89 4/5).

3.3.2.2 Hybridisierung mit der 3'-Sonde

Durch das Screening mit ApaLI und der Sonde H lassen sich gleichzeitig die beiden gewünschten Ereignisse (konditionaler und KO Klon) voneinander unterscheiden. Auch eine eventuell erhaltene Selektionskassette könnte erkannt werden

Von den 169 isolierten Klonen wurden im ersten Schritt 78 getestet. Neben der WT Bande von 7,4 kb (bei den 65 im Blot sichtbaren Klonen) trugen 13 Klone das KO-Allel, zu erkennen an der zusätzlichen Bande von 6,5 kb. Ein Klon war konditional (zusätzliche Bande bei 4,5 kb) und ein weiterer ein Mischklon aus KO und konditionalem KO. Bei diesem waren alle drei Banden sichtbar. Alle anderen Klone, die erkennbar waren, besaßen nur eine WT Bande (Abbildung 3-11 B).

3.3.2.3 Hybridisierung mit der neo-Sonde

Die Blots des primären Screenings wurden mit der Sonde N rehybridisiert, um weitere Integrationen des Vektors an anderen Stellen des Genoms auszuschließen (Abbildung 3-11 C). Keiner der Klone zeigte eine zusätzliche Bande zu der 14 kb Bande, die wiederum auf die Feederzellen zurückzuführen war (3.3.1.5).

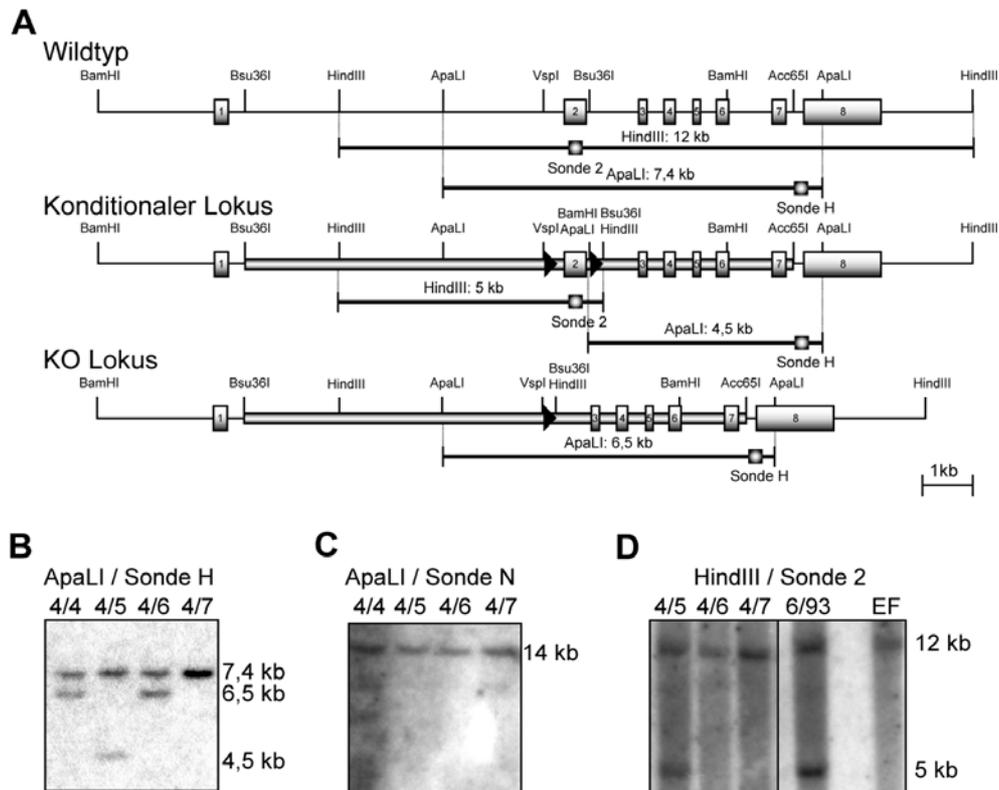


Abbildung 3-11 Zweites Targeting

(A) Lage der verwendeten Sonden und Größe der erwarteten Banden in den Southern Blots. (B-D) Beispielhafte Southern Blots. (B) Primäres Screening mit ApaLI und der Sonde H, neben der Wildtypbande von 7,4 kb erscheint eine zusätzliche Bande bei 6,5 kb bei einem KO Klon, während die zusätzliche Bande bei 4,5 kb einen konditionalen KO-Klon anzeigt. (C) Rehybridisierung des Blots aus (B) mit der Sonde N, um weitere Integranden auszuschließen und die Entfernung der Selektionskassette nachzuweisen. Die Bande bei 14 kb stammt von den Feederzellen (3.3.1.5). (D) Southern Blot mit HindIII und der Sonde 2 zum Nachweis des Exons 2 beim konditionalen KO-Klon (4/5, Bande bei 5 kb neben dem Wildtyp Allel (12 kb)). 6/93: Primärklon, EF: Feederzellen

3.3.2.4 Hybridisierung mit der Sonde 2

Der mit HindIII und der Sonde 2 durchgeführte Blot diente dazu, nochmals auf Abwesenheit des Exons 2 bei den KO Klonen bzw. Anwesenheit beim konditionalen KO-Klon zu testen (Abbildung 3-11 D). Neben der Wildtypbande fand sich hier wie erwartet bei 5 kb eine zusätzliche Bande. Der zur Kontrolle mit aufgetragene Primärklon 6/93 zeigte diese Bande ebenfalls, was darauf zurückzuführen ist, dass in der neo-tk-Kassette direkt 3' der loxP-Seite eine HindIII Schnittstelle liegt (Abbildung 3-10). Ohne diese Schnittstelle hätte die Bande ca. 20 kb groß sein müssen. Gleichzeitig wurde mit diesem Blot nochmals gezeigt, dass keine weiteren Integranden im Genom vorhanden sind.

Insgesamt wurden folgende positiven Klone gefunden:

Tabelle 3.3-1 Positive Klone des zweiten Targetings

Typ	Primärklon	Klon
KO	1/89	1/34, 4/4, 4/6, 4/12, 4/13, 4/17, 4/20, 4/25
	6/93	4/6, 4/10, 4/11, 4/15, 4/28
Konditionaler KO	1/89	4/5

3.3.2.5 PCR

Zur Kontrolle wurden die Klone nochmals mit verschiedenen PCRs getestet.

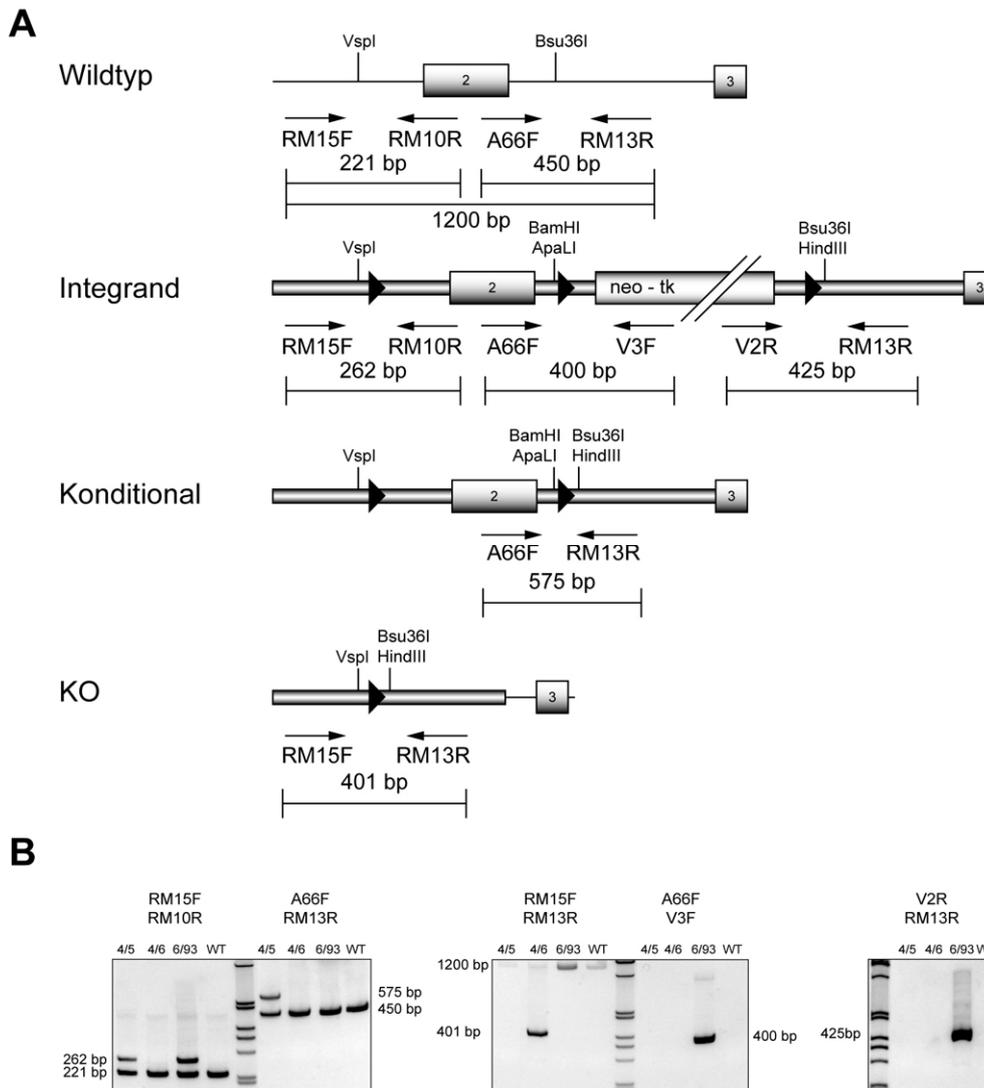


Abbildung 3-12 PCR Kontrollen der Klone

(A) Lage der Primer und Größe der PCR-Fragmente. (B) Abgebildet sind Klone, die injiziert wurden: 1/89 4/6 und 1/89 4/5. 6/93: Primärklon, WT: DNS einer WT-Maus. Links: PCR über den Bereich der ersten loxP-Seite, rechts: der zweiten loxP-Seite. (C) Links: PCR für das KO-Allel, rechts: für das 5' Ende der Selektionskassette. (D) PCR für das 3' Ende der Selektionskassette.

Bei den genotypisierten ES Zellklonen zeigte sich das erwartete Bandenmuster (Abbildung 3-12). Der konditionale Klon 1/89 4/5 zeigte bei der PCR RM15F-RM10R eine Doppelbande,

was bedeutete, dass sowohl diese loxP-Seite als auch das Exon 2 anwesend war. Ebenso war die zweite loxP-Seite vorhanden, zu sehen an der Doppelbande bei der PCR A66F-RM13R.

Der KO Klon 1/89 4/6 zeigte bei der PCR RM15F-RM10R nur die WT Bande ebenso wie bei der PCR A66F-RM13R. In der KO PCR RM15F-RM13R hingegen ist die KO Bande bei 401 bp zu erkennen. Bei beiden Klonen fehlt die Selektionskassette im Gegensatz zum Primärklon 6/93.

Zusätzlich wurden die rekombinierten loxP-Seiten der zu injizierenden Klone sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen waren fehlerfrei.

3.4 Erzeugung der Mauslinien und Aufzucht

Die Erzeugung der genetisch modifizierten Tiere erfolgte am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München. Die Mikroinjektion der ES Zellen in die Blastozysten wurde von Frau Dr. Susanne Feil durchgeführt (2.9).

HCN3/lacZ Reportermauslinie

Um die Lokalisation von HCN3 aufgrund der sehr geringen Expression zu erleichtern, wurde von Dr. Angela Schneider eine zusätzliche ES Zelllinie etabliert. Sie trägt am HCN3 Locus ein β -Galactosidase Reportergenkonstrukt. Dieses ist während der homologen Rekombination inaktiv, da innerhalb des Konstruktes eine gefloxtete neo-Selektionskassette liegt. Bei dieser Linie wurde anschließend kein zweites Targeting zur Entfernung durchgeführt, da nur ein einziger richtig rekombinierter Klon identifiziert werden konnte. Die Cre-vermittelte Rekombination erfolgte hier durch Kreuzung mit einer so genannten Cre-deleter Maus (CMV-Cre, freundlicherweise von Prof. P. Chambon, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire IGBMC, Strassbourg überlassen). Das Allel mit dem inaktiven Reporter wurde mit „HCN3/lacZ“, das rekombinierte und aktive Konstrukt mit „HCN3/ β Gal“ bezeichnet.

3.4.1 Injektion positiver ES-Zellklone

Die in Tabelle 3.3-1 aufgeführten Klone wurden zur Injektion aufgetaut. Zusätzlich wurden vier positive Klone des ersten Targetings (3/27, 3/59, 3/65 und 3/66) verwendet. Während der Kultivierung mussten die KO-Klone 1/34 und 4/17 und der Primärklon 3/59 aufgrund einer Kontamination mit Pilzsporen verworfen werden. Nach genügender Expansion wurden die Klone 1/89-4/5, 1/89-4/6, 1/89-4/25, 6/93-4/28 und der Primärklon 3/27 injiziert (2.9.5). Hinzu kam der Klon 145 der HCN3/lacZ Linie.

Tabelle 3.4-1 Injizierte Klone und die Anzahl der erhaltenen Chimären

Klon	Passage	Typ	Chimären
1/89-4/5	29	Konditional	0 + 2
6/93-4/28	29	KO	2 + 4
1/89-4/25	29	KO	0
1/89-4/6	30	KO	0
3/27	22	Primärklon	0 + 9
145	22	HCN3/lacZ	4

Die verwendeten ES Zellen entstammen einer männlichen Sv129 Blastozyste (Nagy, Rossant et al. 1993). Daraus ergeben sich zwei Konsequenzen: Erstens können nur männliche Chimären die Mutation in der Keimbahn haben und an ihre Nachkommen weitergeben. Zweitens müssen die Nachkommen einer Verpaarung der männlichen Chimären mit schwarzen C57/Bl6 Weibchen agouti-farben (gelbbraun) sein, wenn sie die Mutation tragen.

Die erhaltenen männlichen Chimären (Tabelle 3.4-1, 3 Klone wurden zweimal injiziert) des konditionalen, des KO- und des HCN3/lacZ-Klons wurden im Alter von 7-8 Wochen mit C57/Bl6 Weibchen verpaart. Die aus diesen Verpaarungen hervorgegangenen „agouti“-farbenen Mäuse wurden genotypisiert. In der folgenden Tabelle ist die Keimbahngängigkeit bei den einzelnen Chimären zusammengefasst.

Tabelle 3.4-2 Übersicht über die Keimbahngängigkeit der verschiedenen Klone

Chimäre	Typ	ES Zell Klon	Nachkommen mit braunem Fell	heterozygote Nachkommen
B1901	KO	6/93-4/28	1	0
B1903	KO	6/93-4/28	2	0
B1915	KO	6/93-4/28	15	5
B1924	KO	6/93-4/28	1	0
B1926	KO	6/93-4/28	0	0
B1927	Konditional	1/89-4/5	16	5
B1928	Konditional	1/89-4/5	0	0
B1918	HCN3/lacZ	145	0	0
B1919	HCN3/lacZ	145	13	5
B1920	HCN3/lacZ	145	14	10
B1921	HCN3/lacZ	145	0	0

Die braunen Tiere wurden mit C57/Bl6 WT verpaart und deren heterozygote Nachkommen miteinander, um homozygote Mäuse zu erhalten. Aus heterozygoten Verpaarungen wurden Mäuse mit Mendelscher Verteilung erhalten. Homozygote KO-Tiere zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp. Größe, Gewicht und Fertilität sowohl der Weibchen als auch der Männchen waren normal.

Da die Keimbahn der Chimären rein Sv129 war, wurde durch zusätzliche Verpaarung mit Sv129 WT-Mäusen direkt eine Linie mit reinem Sv129 Hintergrund erhalten. Um einen reinen C57/Bl6 Hintergrund zu bekommen, müssten zehn Generationen Bl6 eingekreuzt

werden. Zum jetzigen Zeitpunkt (Oktober 2004) befindet sich die gemischte Mauslinie in der fünften Generation Bl6.

3.4.2 Nachweis der Mutationen in den Mauslinien

3.4.2.1 Southern Blot

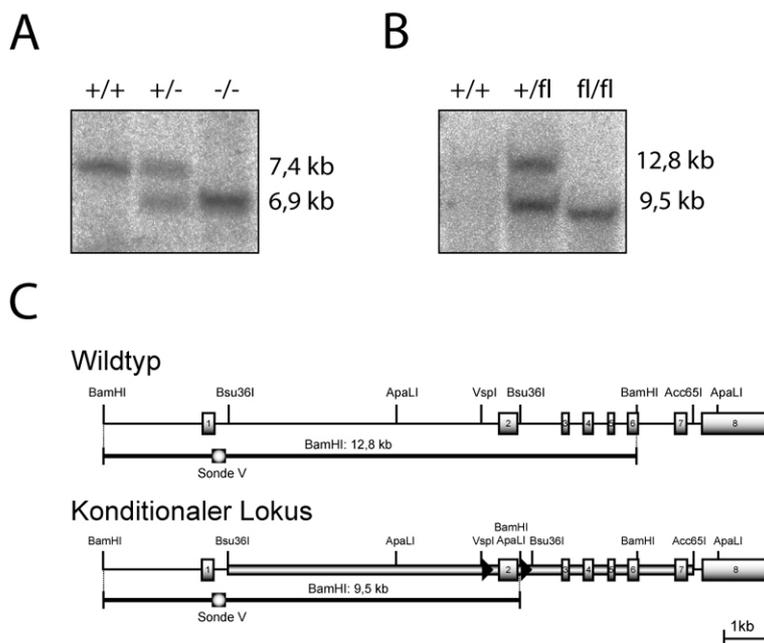


Abbildung 3-13 Southern Blots der gezüchteten Mäuse

(A) KO Linie. (B) Konditionale Mauslinie (*fl*: gefloxtes Allel), die schwache WT Bande ergab sich aufgrund der geringeren DNS Konzentration. (C) Lage der Sonde und Fragmentgrößen für die konditionale Mauslinie.

Von WT-, hetero- und homozygoten HCN3-Mäusen wurde ein Southern Blot mit ApaLI und der Sonde H durchgeführt (Abbildung 3-13 A). Das Bandenmuster entsprach dem der ES Zellen (Abbildung 3-11 A und B).

Bei der geflochtenen Mauslinie funktionierte der Blot mit der Sonde H und ApaLI nicht, welches als Enzym zum Screening der ES Zellen verwendet wurde. Aus diesem Grund wurde der Blot mit der Sonde V und BamHI durchgeführt (Abbildung 3-13 B und C). Die genomische WT-DNS, die als Kontrolle verwendet wurde, war bedeutend geringer konzentriert. Deshalb war die Bande bei 12,8 kb hier deutlich schwächer als bei der heterozygot geflochtenen Maus.

3.4.2.2 RT-PCR

Die Mutation wurde auch auf der Ebene der Transkription bestätigt. Gleichzeitig wurden verschiedene Gewebe auf HCN3-Expression getestet. Es wurden Primer verwendet, zwischen denen mindestens ein Intron lag, um die Amplifikation von DNS auszuschließen. Dadurch wurden mögliche falsch positive Ergebnisse unterdrückt. Zwei unterschiedliche Ansätze wurden gewählt. Im ersten liegt einer der Primer im deletierten Exon 2, es wird nur WT-RNS detektiert. Der zweite Ansatz verwendet Primer, die das deletierte Exon 2 flankieren, das KO-

Transkript ist dann entsprechend kürzer (Abbildung 3-14 A-D). Auf diese Weise konnte HCN3 im Ventrikel nachgewiesen werden. Weiterhin wurde HCN3 im olfaktorischen Epithel bestätigt, jedoch in geringerer Menge als im Gehirn. Eine zusätzliche RT-PCR wurde aus Gehirngewebe der flox- bzw. HCN3/lacZ-Mauslinie durchgeführt, um zu demonstrieren, dass HCN-Transkripte vorhanden bzw. nicht nachweisbar sind.

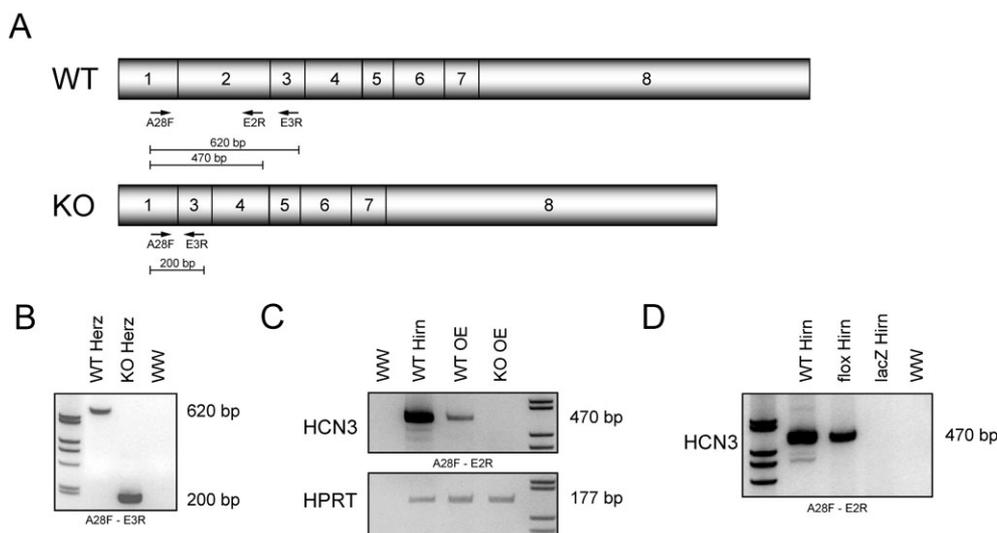


Abbildung 3-14 RT-PCR aus homozygoten WT-, KO-, HCN3/lacZ- und flox-Mäusen

(A) Aufbau der cDNA von WT-/Flox- bzw. KO-Mäusen. Bei der KO-cDNA fehlt das Exon 2. (B) RT-PCR von Exon 1 bis Exon 3 aus Herz-cDNA (Ventrikel), WW: Wasserwert. (C) RT-PCR von Exon 1 bis Exon 2 aus cDNA des olfaktorischen Epithels (OE). Als Kontrolle WT-Hirn-cDNA (zum Größenvergleich) und HPRT zur Quantifizierung. (D) RT-PCR zur Kontrolle, ob HCN3 in Flox-Mäusen exprimiert wird bzw. in HCN3/lacZ-Mäusen fehlt.

3.4.2.3 Western Blot

Auch auf der Proteinebene war in den KO-Tieren kein HCN3 Protein nachweisbar. Die entsprechenden Western Blots sind in der Abbildung 3-17 gezeigt.

3.4.3 In vivo Rekombination der HCN3/lacZ Mauslinie

Die HCN3/lacZ Mauslinie wurde mit einer CMV-Cre Mauslinie verkreuzt. Diese exprimiert die Cre Rekombinase ubiquitär in allen Geweben. Hierdurch wird die neo-Selektionskassette aus dem Reporter-genkonstrukt ausgeschnitten und die β -Galactosidasetranskription ermöglicht (Abbildung 3-15 A). Der Nachweis der Rekombination erfolgte mit PCR (Abbildung 3-15 B) und zusätzlich mit RT-PCR.

Aus der cDNA wurde der Übergang vom Exon 1 in die IRES-Sequenz im Exon 2 (Abbildung 3-15 A) zur Verifizierung der korrekten Integration des Reporterkonstrukts sequenziert. Um die richtige Rekombination nachzuweisen, wurde zusätzlich noch die verbleibende loxP-Seite und deren Umgebung sequenziert.

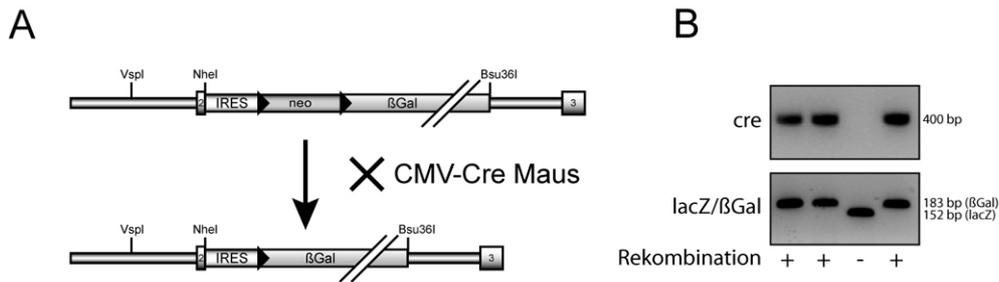


Abbildung 3-15 Cre Rekombination bei der HCN3/lacZ Mauslinie durch Verkreuzung mit CMV-Cre
 (A) HCN3/lacZ Lokus vor und nach der Rekombination. Die neo-Kassette wurde ausgeschnitten. (B) PCR Nachweis der Rekombination, die Cre-positiven Tiere der HCN3/lacZ Mauslinie zeigen die rekombinierte Bande (Abbildung 3-16)

3.4.4 PCR zur routinemäßigen Genotypisierung

Neugeborenen Tieren wurde zur Markierung zwischen Tag 7 und 21 eine DNS-Probe entnommen und diese zur Genotypisierung (2.1.2.1 und 2.1.6.2) verwendet. In der folgenden Abbildung sind die verwendeten Primer und deren PCR-Produkte dargestellt.

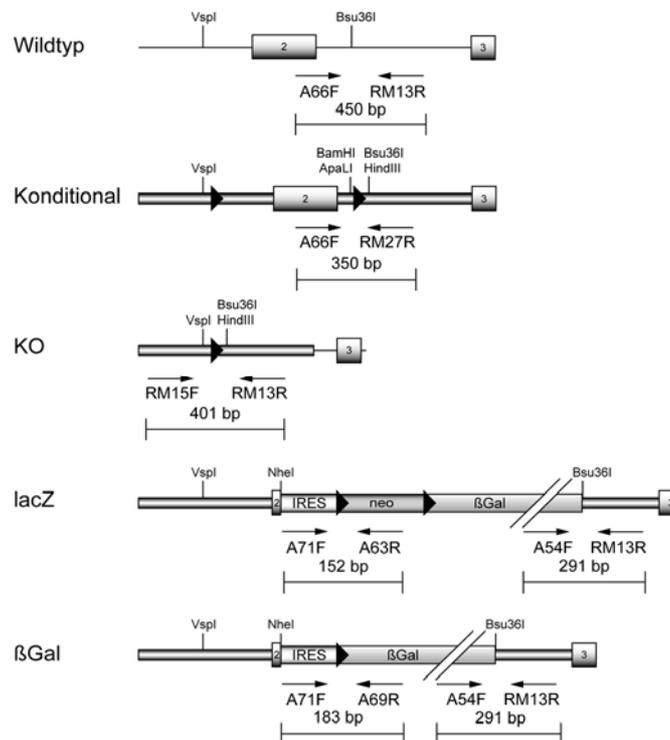


Abbildung 3-16 Position aller benötigten Primer für die Genotypisierung der verschiedenen Mauslinien

3.5 Lokalisation des HCN3 Kanals

3.5.1 Western Blot

Auch auf der Ebene der Proteine war bei den KO-Mäusen HCN3 nicht nachweisbar. Drei verschiedene Gewebe wurden getestet: Hirn, olfaktorischer Bulbus und Retina.

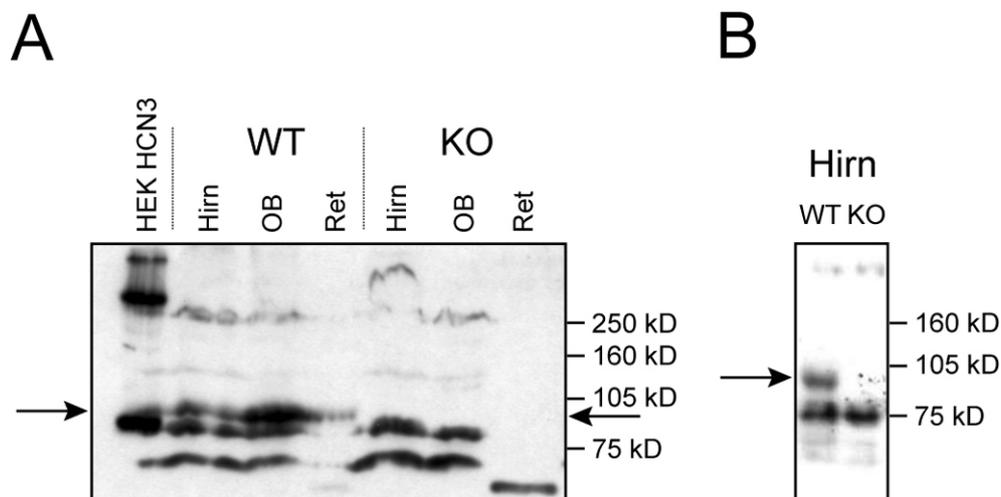


Abbildung 3-17 Western Blots aus Mausgewebe

(A) Western Blot aus Gehirn, olfaktorischem Bulbus und Retina. Die Höhe der HCN3 Bande aus HEK-Zellen ist niedriger als im Gewebe, da hier HCN3 nicht glykosiliert ist. (B) Western Blot mit jeweils 45 µg Protein aus Mausgehirn. Die in neuronalem Gewebe auftauchende Nebenbande kann als Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge verwendet werden.

Während in Lysaten aus Gehirngewebe (auch aus dem olfaktorischem Bulbus) eine Nebenbande ungefähr auf der Höhe der unglykosilierten Form von HCN3 (86 kD, HEK HCN3) auftaucht, ist dies bei Lysaten aus der Retina nicht der Fall. Die HCN3 Bande aus den Gewebelysaten (>90 kD) ist bei den KO Geweben nicht mehr vorhanden.

Zusätzlich zu dem von uns hergestellten Antikörper wurden zwei weitere, nicht kommerziell erhältliche, Antikörper getestet. Der erste wurde uns freundlicherweise von Dr. Frank Müller (Institut für biologische Informationsverarbeitung, Jülich) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um einen monoklonalen Antikörper aus der Ratte, der wie unser Antikörper gegen ein C-terminales Epitop gerichtet ist (Müller, Scholten et al. 2003). Ein weiterer Antikörper aus Kaninchen wurde uns freundlicherweise von Prof. R. Shigemoto (Division of Cerebral Structure, National Institute for Physiological Sciences, Myodaiji, Okazaki, Japan) zur Verfügung gestellt. Dieser Antikörper wurde bisher nicht veröffentlicht.

Während mit dem Ratten-Antikörper kein Unterschied zwischen KO und WT festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt), ergab sich mit dem japanischen Kaninchen-Antikörper ein ähnliches Bild wie durch unseren Antikörper (Abbildung 3-18). In der verwendeten Verdünnung (1:500) war das Signal jedoch deutlich stärker, allerdings auch die unspezifischen Banden

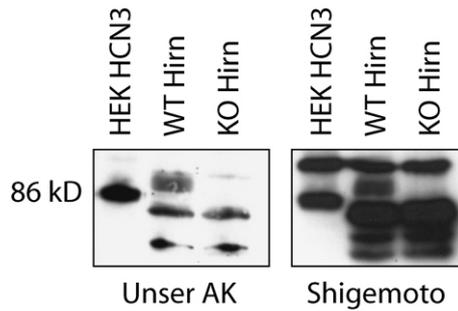


Abbildung 3-18 Vergleich der beiden Antikörper

Es wurde jeweils 45 μ g Hirnlysate aufgetragen. Die Belichtungszeit war bei beiden Blots gleich.

3.5.2 Histochemie

Die Lokalisation der HCN3 Expression in verschiedenen Organen wurde zum einen mit den HCN3 Antikörpern durchgeführt, zum anderen unter Verwendung der Reportermauslinie. In der HCN3/ β Gal-Mauslinie wurde das Reportergen β -Galactosidase unter die Kontrolle des HCN3-Promoters gesetzt (3.4). Mit Hilfe der XGal-Färbung oder β Gal-Antikörpern ließ sich die Expression nachweisen.

Retina

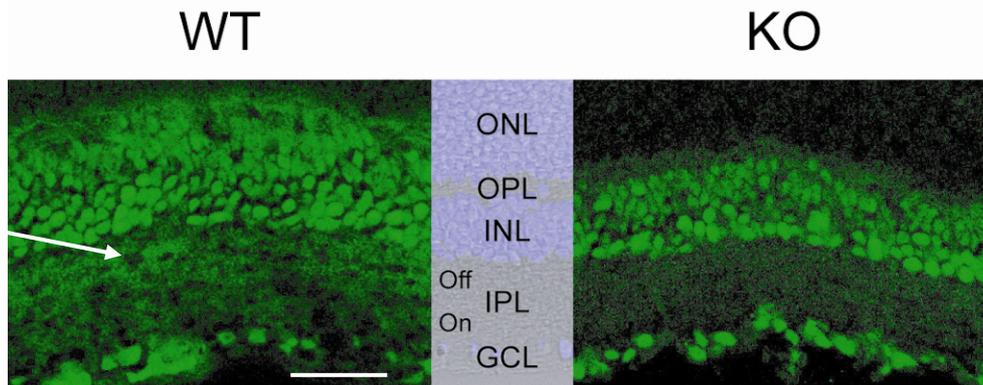


Abbildung 3-19 HCN3 ist im Bereich der Synapsen der Off-Bipolarzellen in der inneren plexiformen Schicht lokalisiert

Immunhistochemie mit unserem anti-HCN3-Antikörper und einem sekundärem FITC-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper (grün). Pfeil: spezifisches Signal. Blau: Kernfärbung mit Hoechst, ONL, äußere nukleäre Schicht (Somata der Photorezeptoren), OPL, äußere plexiforme Schicht (Synapsen der Photorezeptoren), INL, innere nukleäre Schicht (Somata der Horizontal-, Bipolar- und Amakrinzellen), IPL, innere plexiforme Schicht (Synapsen der Off- und On-Bipolarzellen und der Amakrinzellen), GCL, Ganglienzellschicht. Maßstab: 40 μ m.

Erste Tests des HCN3 Antikörpers wurden mit Mausretina durchgeführt. Im KO war hier, neben einer starken unspezifischen Färbung in den nukleären Schichten, ein schwaches spezifisches Signal zu beobachten. Es befand sich in der inneren plexiformen Schicht, und zwar in dem Teil, in dem sich die Synapsen der Off-Bipolarzellen und der Amakrinzellen befinden (Abbildung 3-19). In diesem Bereich findet die Verschaltung auf die Ganglienzellen statt.

Hirn

Auf Hirngewebe der Maus funktionierten alle bisher getesteten HCN3 Antikörper nicht. Sowohl im WT als auch im KO war praktisch jede Zelle unspezifisch angefärbt. Auch die Untersuchung der HCN3/ β Gal-Mauslinie ergab bisher kein HCN3-spezifisches Signal.

Olfaktorisches Epithel

Auch hier waren mit unserem HCN3 Antikörper keine Unterschiede zwischen WT und KO zu erkennen. Nach einigen Optimierungen wurde aber mit Hilfe der Reportermauslinie und der XGal-Färbung letztendlich doch ein spezifisches Signal erhalten.

Kryoschnitte aus entkalkifiziertem Gewebe (2.5.2.1) wurden auf dem Objektträger mit der Färbelösung inkubiert (2.5.3.3). Dabei zeigte sich eine deutliche Färbung, die regional begrenzt war (Abbildung 3-20 A). Das gleiche Bild ergab sich bei Detektion der β -Galactosidase über einen Antikörper und anschließender DAB-Färbung (Abbildung 3-20 B).

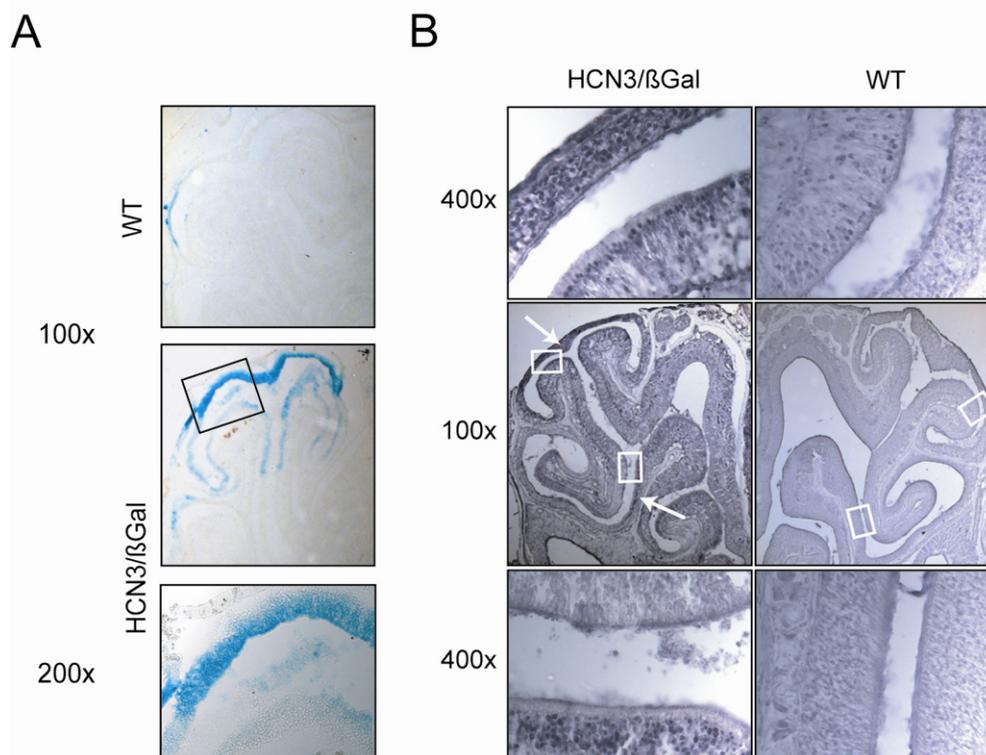


Abbildung 3-20 Detektion der β -Galactosidase über XGal und mittels eines Antikörpers

(A) XGal-Färbung nach 24 Stunden Inkubation, ganz unten ein vergrößerter Ausschnitt. (B) Nachweis der β -Galactosidase mit einem monoklonalen β -Galactosidase Antikörper (Promega, 1:500), in der Mitte die Übersicht über jeweils eine Hälfte des Epithels (zentral befindet sich die Nasenscheidewand). Maßstäbe: 100 μ m (100x), 50 μ m (200x und 400x)

Herz

Zur Detektion von HCN3 im Herz wurde ebenfalls die HCN3/ β Gal-Mauslinie verwendet. Im Ventrikel wurde jede Zelle markiert (Abbildung 3-21 B und Abbildung 3-22 A). Der β -Galactosidase Antikörper ist ein monoklonaler Mausantikörper, daher wurde eine unspezifische Färbung durch den sekundären Maus-Antikörper im WT-Gewebe erwartet. Dies war praktisch jedoch nicht der Fall. Der sekundäre Antikörper zeigte auf HCN3/ β Gal-Gewebe allein bereits eine Färbung, die im WT nicht sichtbar war (Abbildung 3-21 C).

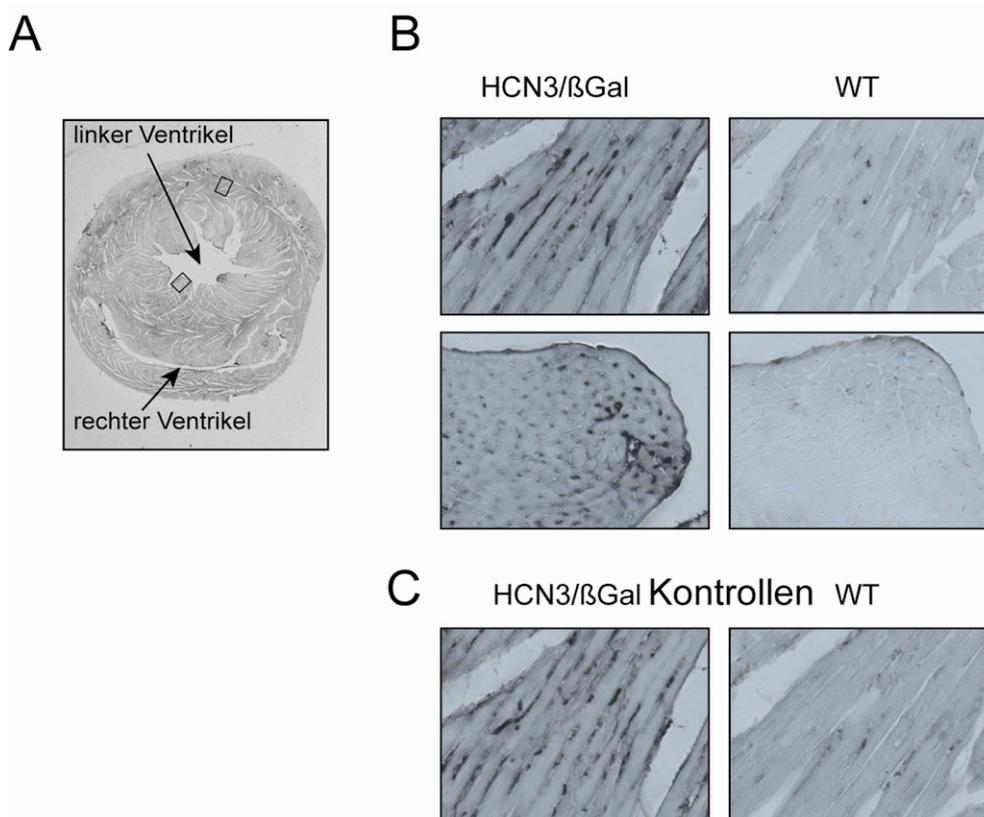


Abbildung 3-21 β -Gal Immunhistochemie und DAB Färbung auf Herzgewebe

(A) Übersicht über einen Herzquerschnitt in der Mitte der Herzachse. (B) 400 fach vergrößerte Ausschnitte aus HCN3/ β Gal- bzw. WT- Herzen, oben Fasern im Längsschnitt, unten im Querschnitt. (C) HCN3/ β Gal- und WT-Kontrollschnitte ohne Inkubation mit dem primären anti- β -Galactosidase-Antikörper.

Da die β -Galactosidase ein cytosolisches Protein ist, findet sich die Färbung überall im Sarkoplasma der Herzmuskelzelle. Den größten Teil einer Muskelzelle machen Myofibrillen aus, deshalb befindet sich das Zellplasma vorwiegend nahe der Zellmembran und im perinukleären Raum (der Bereich um die Zellkerne). Die daraus resultierende zellmembranständige und perinukleäre Färbung lässt sich in der Fluoreszenzaufnahme (Abbildung 3-22 A) deutlich erkennen. Hier wurden die Zellkerne mit Hoechst gegengefärbt.

Der fluoreszierende sekundäre Antikörper war spezifischer als der Biotin-konjugierte, der für die DAB-Färbung verwendet wurde. Der Kontrollschnitt des HCN3/ β Gal-Gewebes zeigte praktisch kein Signal.

Im Vorhof wurde eine andere Verteilung der HCN3/ β -Galactosidase-Expression beobachtet. Hier war die Färbung vor allem an den endo- und stärker noch an den epikardialen Oberflächen ausgeprägt (Abbildung 3-22 B).

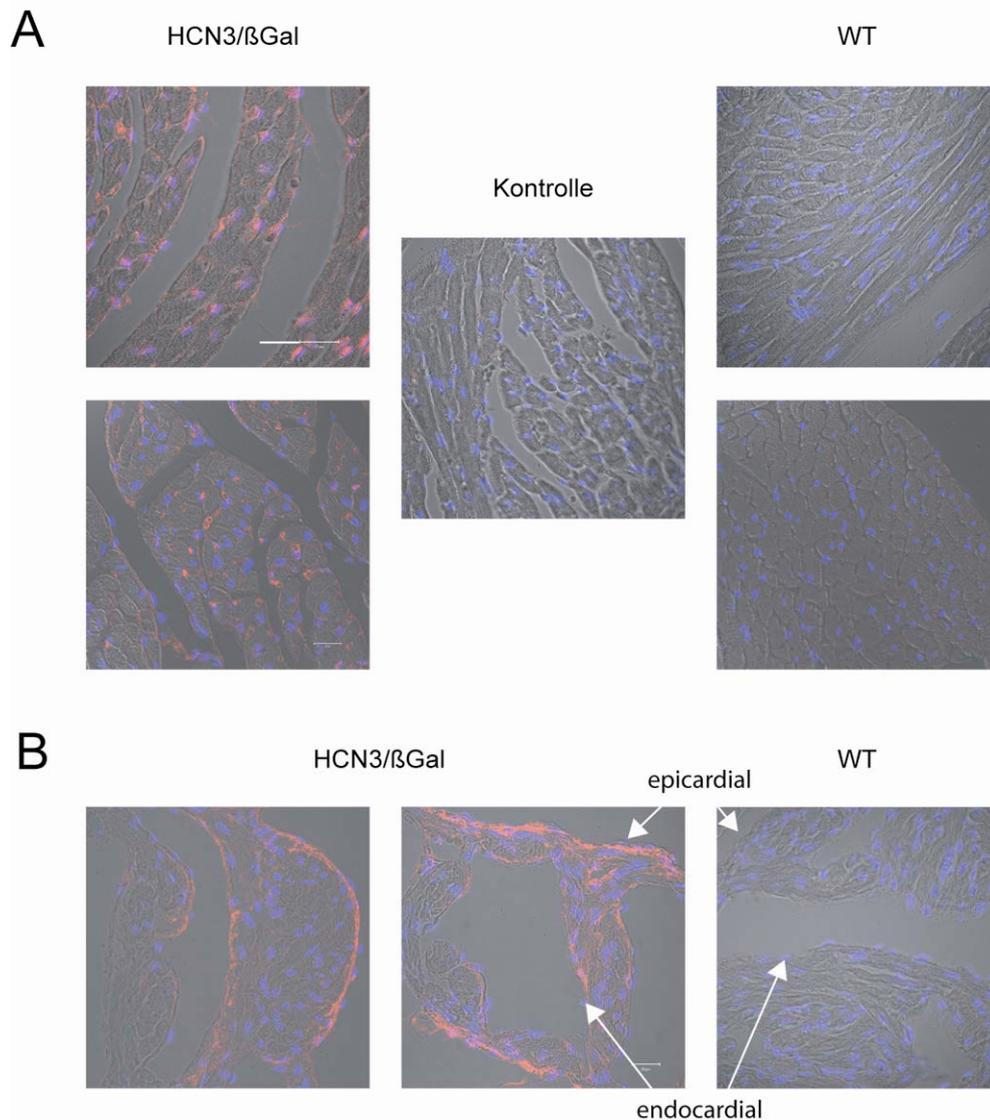


Abbildung 3-22 HCN3/ β Gal-Immunhistochemie aus Ventrikel und Vorhof

Blau: Hoechst-gefärbte Kerne, Rot: β -Galactosidase (A) 40 fach vergrößerte Ausschnitte aus Querschnitten von HCN3/ β Gal- bzw. WT-Ventrikeln. Kontrolle, ein HCN3/ β Gal-Schnitt ohne Inkubation mit dem primären anti- β -Galactosidase Antikörper. (B) Querschnitte durch Vorhofgewebe mit epi- und endocardialen Oberflächen. Bei (A) und (B) handelt es sich um Aufnahmen von denselben Schnitten. Maßstab 20 μ m

3.6 Verhaltensversuche

Die Verhaltensversuche wurden am Institut für Neuroanatomie und Verhalten der medizinischen Fakultät der Universität Zürich durchgeführt. Mein Dank gilt hier Prof. H.P.

Lipp, PD Dr. David P. Wolfer und Dr. Hans Welzl, die mich bei der Versuchsdurchführung und der Auswertung unterstützt haben.

Für alle Verhaltensversuche wurden die gleichen 18 Wildtypen und 13 KO-Tiere eingesetzt. Die Tiere sind „litter-matched, d.h. für jedes KO-Tier gibt es mindestens ein WT-Geschwistertier. Das Alter der Tiere betrug zwischen 2 und 4 Monaten.

3.6.1 Morris Water maze

Das Morris Water maze ist ein Paradigma zur Untersuchung des Hippocampus-abhängigen räumlichen Lernens (Morris 1984; Redish und Touretzky 1998). Tiere mit einer Läsion im Bereich des Hippocampus sind nicht in der Lage, anhand des sie umgebenden Raumes die Position einer unter Wasser versteckten Plattform zu erlernen. Sie werden sie im Gegensatz zu gesunden Tieren allenfalls per Zufall finden. Wird nach einigen Trainingsdurchgängen die Plattform an eine andere Position versetzt, richtet sich die Suche normaler Tiere im Gegensatz zu denen mit einer Läsion auf die bisherige Position. Ist die Plattform hingegen sichtbar, so zeigt sich keine Beeinträchtigung. Der Hippocampus ist in die Positionsbestimmung im Raum involviert (Arns, Sauvage et al. 1999).

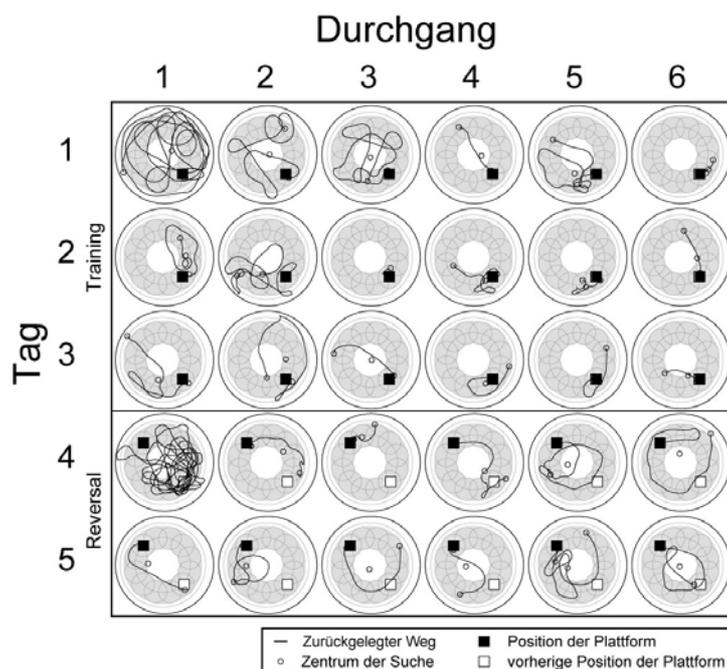


Abbildung 3-23 Morris Water maze. Beispiel des räumlichen Lernens einer WT-Maus.

Während der ersten vier Durchgänge ist deutlich zu beobachten, wie das Tier die Position der Plattform erlernt. Auch an den nächsten zwei Tagen hat sie keinerlei Probleme, die Plattform zu finden. Am Tag 4 wird die Plattform auf die gegenüberliegende Position verschoben (reversal). Bereits im zweiten Durchgang wird sie von der Maus gefunden.

Dieser Test eignet sich allgemein, um Unterschiede im räumlichen Lernen zu erkennen zu können und damit eine eventuelle funktionelle Veränderung des Hippocampus. Beispielhaft ist der von einer WT-Maus zurückgelegte Weg im Verlauf des Versuchs gezeigt (Abbildung 3-23).

Beim ersten Durchgang muss die Maus erst einmal lernen, dass es eine unsichtbare Plattform gibt. Wasser ist eine aversive Umgebung für Mäuse und erzeugt starken Stress bei den Tieren. Primär versuchen sie deshalb, eine Fluchtmöglichkeit am Beckenrand zu finden und schwimmen deshalb die meiste Zeit dort entlang (Thigmotaxis). Bereits im zweiten Durchgang hat das Tier gelernt, dass es eine versteckte Plattform und keine Fluchtmöglichkeit am Rand gibt. In den weiteren Durchgängen der ersten drei Tage beobachtet man, dass das Tier meist den direkten Weg zur Plattform einschlägt und die benötigte Zeit immer geringer wird.

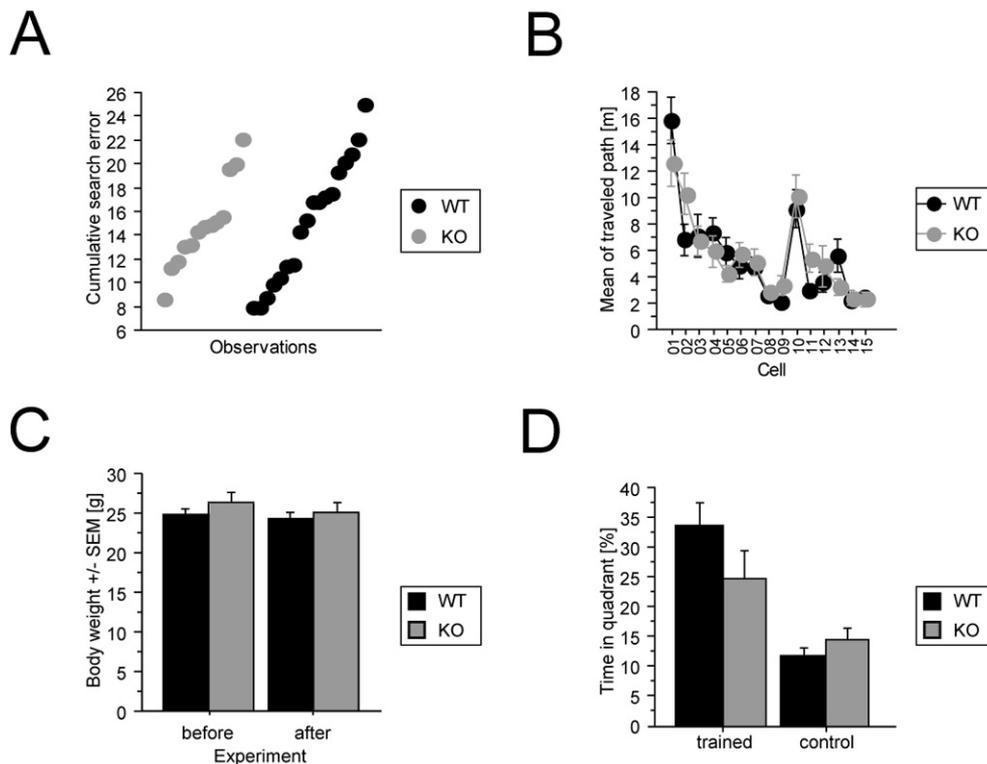


Abbildung 3-24 Statistische Auswertung des Water maze

(A) Scatterplot für den „cumulative search error“ (cse), ein Wert für Dauer und zurückgelegte Wegstrecke bis zur Plattform. (B) Vergleich der zurückgelegten Wege zwischen WT und KO. Um Schwankungen zu verringern, ist jeder Punkt die Addition von zwei Durchgängen (cell) aller Tiere, in Meter +/- SEM. (C) Veränderung des Körpergewichts infolge des durch den Versuch ausgelösten Stresses können den Test beeinflussen, in Gramm +/- SEM. (D) Aufenthaltsdauer im trainierten Quadranten (trained) im 19. Durchgang während der ersten Minute im Vergleich zu allen anderen Quadranten (control), in % +/- SEM.

Im neunzehnten Durchgang (am Tag vier) findet der eigentliche Test statt. Die Plattform wird in den gegenüberliegenden Quadranten verschoben. Wenn die Maus anhand der räumlichen Umgebung gelernt hat, wo die Plattform sein sollte, wird sie die meiste Zeit im entsprechenden Quadranten verbringen und die Plattform suchen. Nach einer gewissen Zeit wird sie immer weitere Kreise ziehen und schließlich die neue Position entdecken.

WT- und KO-Tiere zeigten auf den ersten Blick keinen Unterschied in ihrer Lernleistung (Abbildung 3-24 A). Der „kumulative Suchfehler“ ist ein Wert, der sich aus dem Weg und der Dauer bis zum Erreichen der Plattform errechnet. Die Verteilung war bei beiden Gruppen

gleich. Kein Unterschied zeigte sich auch beim zurückgelegten Weg im Verlauf der einzelnen Durchgänge (Abbildung 3-24 B). Der Mittelwert des zurückgelegten Weges reduziert sich während der Trainingsdurchgänge bei beiden Gruppen in gleichem Maße. Beim „reversal“ (Durchgang 19) wird die zurückgelegte Wegstrecke länger, danach geht die durchschnittliche Streckenlänge schnell wieder zurück. Zur Verringerung von Schwankungen repräsentiert hier jeder Punkt einen Durchschnittswert von jeweils zwei Durchgängen.

Ein Faktor, der die Lernleistung der Tiere stark beeinflussen kann, ist Stress. Um auszuschließen, dass die aversive Umgebung (Wasser) bei den beiden Gruppen unterschiedlich starken Stress auslöst, wurden zu Beginn und nach Abschluss des Versuchs die Körpergewichte verglichen. Gewichtsabnahme ist ein Indikator für Stress. WT- und KO-Tiere hatten beide im gleichen Ausmaß geringfügig abgenommen (Abbildung 3-24 C). Dies ließ darauf schließen, dass die Tiere in diesem Test vergleichbar auf den Stress reagieren.

Als weiterer Parameter wurde noch die Zeit bestimmt, welche die Tiere im Durchgang 19 in dem Quadranten verbringen, in dem sich die Plattform zuvor befand. Beide Gruppen zeigten während der ersten 60 Sekunden eine signifikante Präferenz für den trainierten Quadranten (Abbildung 3-24 D). Der Unterschied zwischen WT und KO ist auch hier nicht signifikant.

Es wurden noch ca. 30 weitere Parameter ausgewertet, z. B. Thigmotaxis (Schwimmen an der Beckenwand), Dauer bis zur Richtungsentscheidung, Floating (unbewegt im Wasser). Hier zeigten sich jedoch ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

3.6.2 Open Field Test

Wird eine Maus in einen für sie unbekanntem, leeren Raum gesetzt, wird sie sich in diesem bewegen, um ihn zu erkunden. Mit der Zeit wird aufgrund von allmählicher Gewöhnung („habituation“) ihre Aktivität nachlassen. Mit Hilfe des „Open field“ Tests lassen sich sowohl eine gesteigerte oder verminderte Bewegungsaktivität als auch eine veränderte Gewöhnung feststellen. Da offene helle Räume aversiv für Mäuse sind, kann ein vermindertes Erkunden des zentralen Bereichs ein Indikator für ein verstärktes Angstverhalten sein (Prut und Belzung 2003).

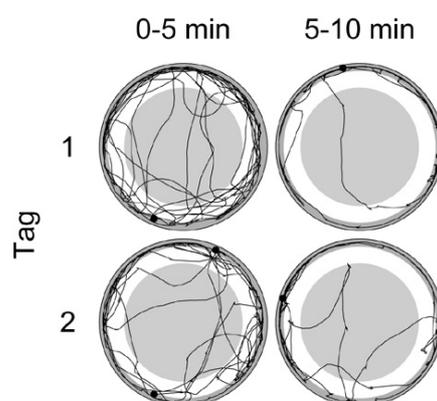


Abbildung 3-25 Open Field Test. Beispiel des aufgezeichneten Weges für ein WT-Tier

Pro Tag wurden die Tiere jeweils zehn Minuten in das Becken gesetzt. Der Versuch war in zwei Aufnahmen von je fünf Minuten gesplittet.

Dieser Versuch testet das explorative Verhalten der Maus. An der beispielhaft abgebildeten Aufzeichnung (Abbildung 3-25) lassen sich zwei Verhaltensweisen deutlich erkennen. Erstens beobachtet man das Vermeiden des inneren Bereichs, der 80% der Gesamtfläche ausmacht. Das Tier bewegt sich dort nur sehr wenig. Zweitens stellt man eine ausgeprägte Habituation fest, die Maus gewöhnt sich an den Raum. In den zweiten fünf Minuten ist deutlich weniger Bewegung auszumachen.

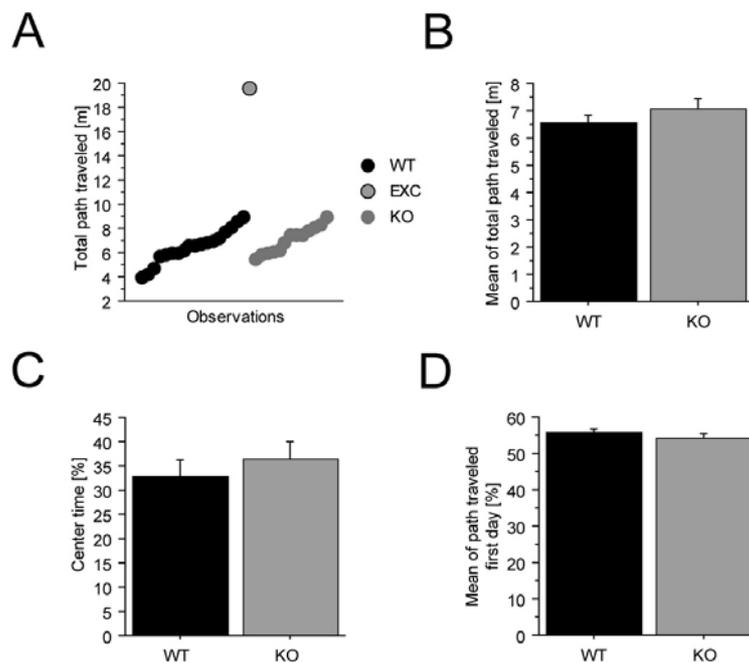


Abbildung 3-26 Statistische Auswertung des Open Field Tests

(A) Scatterplot für den zurückgelegten Weg jedes einzelnen Tieres. Eine Maus (M1411, WT) wurde aufgrund exzessiven Rennens im Kreis ausgeschlossen (EXC). (B) Mittelwerte der zurückgelegten Strecken je Gruppe in Meter +/- SEM. (C) Mittelwerte der im zentralen Bereich verbrachten Zeit je Gruppe in % +/- SEM. (D) Mittelwerte des am ersten Tag zurückgelegten Wertes in % +/- SEM

Einen ersten Überblick über das Verhalten der Mäuse gibt der insgesamt zurückgelegte Weg. Hier fließt sowohl die allgemeine Aktivität, als auch das explorative Verhalten und die Habituation ein. Dabei zeigte sich, dass bis auf eine Maus alle in etwa die gleiche Strecke zurücklegten (Abbildung 3-26 A). Eine Maus (M1411, WT) rannte exzessiv im Kreis und legte dadurch den ca. dreifachen Weg zurück. Dies konnte auch außerhalb des Tests im Käfig beobachtet werden. Solch ein Verhalten ist im Zusammenhang mit einer Ohrinfektion bekannt. Aus diesem Grund wurde das Tier aus der weiteren statistischen Auswertung ausgeschlossen. Im Durchschnitt legten beide Gruppen, WT und KO, in den zehn Minuten eine Gesamtstrecke von ca. 6,5 bzw. 7 Metern zurück. Dies war nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 3-26 B).

Ein weiterer untersuchter Parameter war die Aufenthaltsdauer im hellen, aversiven Zentralbereich des Beckens. Beide Gruppen hielten sich in diesem großen Bereich (80 % der Gesamtfläche) nur zu 33 % (WT) und 36 % (KO) auf. Auch hier ist die Differenz nicht statistisch signifikant. Untersucht wurde auch die Habituation. Dazu wurde der Anteil der am ersten Tag zurückgelegten Strecke an der insgesamt zurückgelegten Strecke bestimmt. Es wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt (56 % (WT) und 54 % (KO)).

3.6.3 Dark-Light-Transition Test

Eine neue Umgebung zu erkunden gehört zum natürlichen Verhalten von Mäusen. Allerdings haben sie eine angeborene Präferenz für dunkle, umschlossene gegenüber hell erleuchteten, offenen Bereichen (aversive Umgebung). Bei diesem Test muss die Maus den Konflikt zwischen ihrer angeborenen Aversion gegen helle, offene Räume und ihrer natürlichen Neugier lösen. Dieser Test wurde als ein Paradigma für Angst-Verhalten eingeführt (Crawley und Goodwin 1980). So konnte z.B. gezeigt werden, dass Anxiolytika wie Diazepam die Aufenthaltsdauer im offenen Raum erhöhen (Rudolph, Crestani et al. 1999).

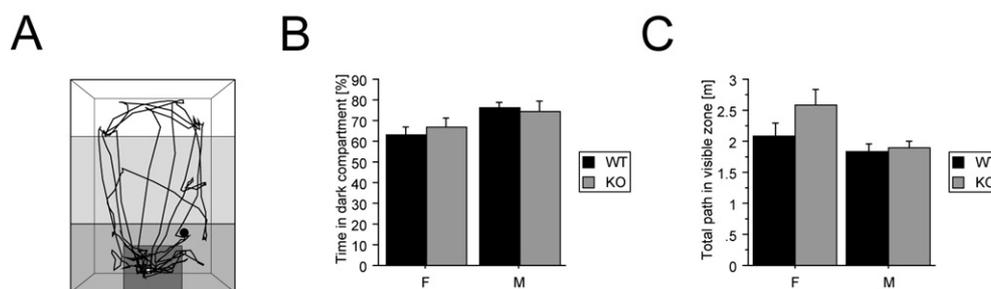


Abbildung 3-27 Light-Dark-Transition Test

(A) Aufgezeichnete Weg einer WT-Maus, der dunkelgraue Bereich im unteren Teil stellt den Übergang in die dunkle Box dar, die verschiedenen Grautöne zeigen die Aufenthaltswahrscheinlichkeit. (B) In der dunklen Box verbrachte Zeit, aufgeschlüsselt nach männlich/weiblich und WT/KO in Prozent +/- SEM. (C) Im sichtbaren Bereich zurückgelegter Weg in Meter +/- SEM.

Das Tier wird zuerst einmal die dunkle Box erkunden und sich vorwiegend in ihr bzw. an der Öffnung aufhalten (Abbildung 3-27 A). Nach einer gewissen Zeit erkundet sie auch den hellen Bereich.

Auch bei diesem Test waren keine Unterschiede zwischen WT und KO zu erkennen. Eine, wenn auch nicht signifikante, Differenz ergab sich zwischen den Geschlechtern. Die Weibchen zeigten ein erhöhtes exploratives Verhalten im Vergleich zu den Männchen. Sie hielten sich ca. 65 % der Versuchszeit im dunklen Bereich auf, während die Männchen ca. 75 % der Zeit dort verbrachten (Abbildung 3-27 B). Die KO Weibchen legten im hellen Bereich einen halben Meter mehr zurück als die WT Weibchen und alle Männchen. Dieser Unterschied ist jedoch ebenfalls nicht signifikant.

3.6.4 Rotarod

Das Rotarod ist ein Test für motorische Koordination und motorisches Lernen. Das Tier muß auf einem rotierenden, griffigen Stab (Durchmesser ca. 3 cm) balancieren. Dies erfordert die koordinierte Funktion der Propriozeptoren in Zusammenarbeit mit der Motorik. Die Steuerung findet in den motorischen Zentren des Cerebellums statt. Bei einem Defekt in diesen Bereich des Cerebellums lässt sich hier eine verminderte Leistung erkennen. Zum Beispiel zeigt eine transgene Maus, die die Mutation der Huntingtonschen Krankheit trägt, ab einem Alter von ca. 6 Wochen eine wesentlich geringere Leistung (Carter, Lione et al. 1999). Mäuse, die defizient für HCN1 sind, sind in diesem Test ebenfalls schlechter als WT-Tiere (Nolan, Malleret et al. 2003)

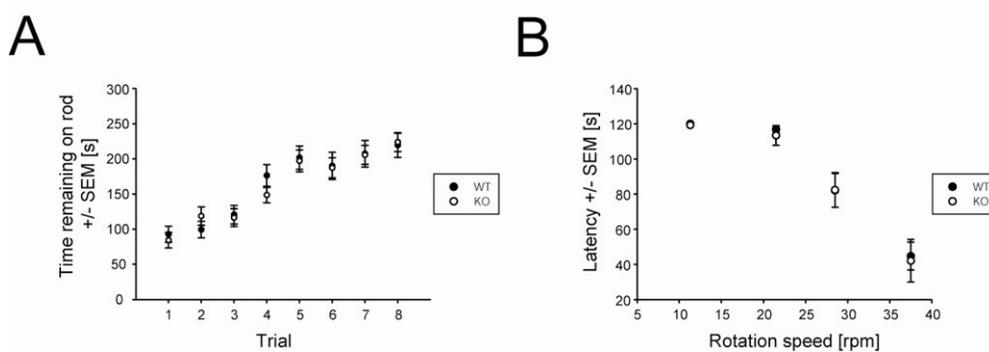


Abbildung 3-28 Statistische Auswertung Rotarod

(A) Beschleunigendes Rotarod, innerhalb von 5 Minuten erhöht sich die Geschwindigkeit des rotierenden Stabes von 4 auf ca. 40 rpm. Es wurde die Zeit bis zum Herunterfallen bestimmt. Die ersten vier Durchgänge fanden am ersten Tag, die zweiten vier am folgenden Tag statt. (B) Rotarod mit konstanter Geschwindigkeit, die Tiere wurden nacheinander bei 37,5, 28,5, 21,5 und 11,3 rpm auf die Stange gesetzt und die Zeit bis zum Herunterfallen bestimmt.

Bei beiden Versuchsprotokollen schnitten WT und KO-Tiere gleich gut ab. Beim beschleunigenden Rotarod nahm die Leistung der Tiere stetig zu, sie blieben länger und bei höheren Geschwindigkeiten auf der rotierenden Stange (Abbildung 3-28 A). Bei konstant gehaltener Geschwindigkeit waren alle Tiere in der Lage, bis ca. 20 rpm über die ganze Versuchsdauer von zwei Minuten auf der Stange zu balancieren (Abbildung 3-28 B). Bei höheren Geschwindigkeiten reduzierte sich die Zeit (bei 37,5 rpm: WT 44,7 +/- 7,9 s, KO 42,1 +/- 12,0 s). Es war kein Unterschied feststellbar.

3.6.5 Geruchsaversionstest

Dieser Test ist ein klassischer Konditionierungstest. Aus einem neutralen Reiz (NS – neutraler Stimulus), der zunächst keine bestimmte Reaktion auslöst, wird ein Reiz (CS – konditionierter Stimulus), auf den in einer bestimmten Weise reagiert wird. Dies geschieht, wenn in zeitlicher Nähe des NS ein weiterer, negativer Reiz (US – un konditionierter Stimulus) auftritt. Macht das Tier diese Erfahrung ein bis mehrere Male (je nach Stärke des US), beobachtet man auf einen weiteren CS (ohne zusätzlichen US) hin eine konditionierte Reaktion. Das Tier reagiert, als ob der negative Reiz ausgelöst worden wäre.

Dieser Test wurde aufgrund der Ergebnisse der EOG-Untersuchungen in Bochum am Lehrstuhl für Zellphysiologie (Prof. Dr. Dr. H. Hatt) durchgeführt (4.3).

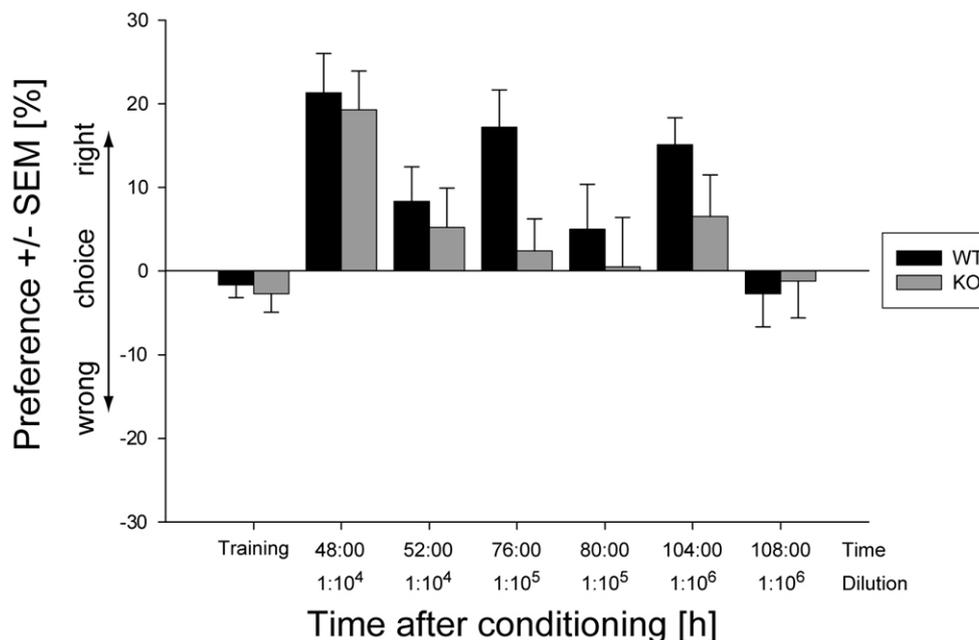


Abbildung 3-29 Geruchsaversionstest

Auf der X-Achse sind die Zeit nach der Konditionierung und die getestete Verdünnung aufgetragen. Training zeigt die Präferenz vor der Konditionierung. Positive Balken zeigen die richtige Wahl an (die Flasche ohne den konditionierten Stimulus), negative die falsche.

Die Tiere zeigten während des Trainings nur eine geringe Präferenz für die zuerst angebotene Flasche (Abbildung 3-29). Dies wurde zur Kontrolle verwendet, damit sie nicht eine der beiden angebotenen Flaschen bevorzugen. Während des Tests (ab 48 Stunden nach der Konditionierung) bekamen die Tiere immer zuerst die Flasche mit dem konditionierten Stimulus (CS). Nach 48 Stunden waren WT- und KO-Mäuse gleich gut im Vermeiden (21,3 +/- 4,7 % vs. 19,3 +/- 4,6 %). Nach weiteren 24 Stunden und einer Reduktion der Konzentration des CS um den Faktor 10 war hier ein größerer Unterschied zu beobachten (17,1 +/- 4,5 % (WT) vs. 2,4 +/- 3,9 % (KO)). Diese Differenz war allerdings nicht statistisch signifikant ($p = 0,09$). Nochmals 24 Stunden später und bei einer CS-Konzentration von 1:10⁶ war der Unterschied wieder geringer (15,1 +/- 3,2 % (WT) vs. 6,5 +/- 5,0 (KO)).

3.7 Analyse der Herzfunktion

3.7.1 EKG

Die Implantation der Transponder und die Aufzeichnung der EKGs wurde von Dr. Juliane Stieber am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU München durchgeführt.

Für jedes Tier wurde neben dem EKG auch die Aktivität aufgezeichnet. Der EKG-Empfänger registriert die Bewegungen der Maus. Je nach Versuch wurden Langzeit EKGs aufgenommen

oder kurze Sequenzen von 20 Sekunden, die im Abstand von 1 bis zu 30 Minuten gespeichert wurden.

3.7.1.1 Aktivität und Herzfrequenz

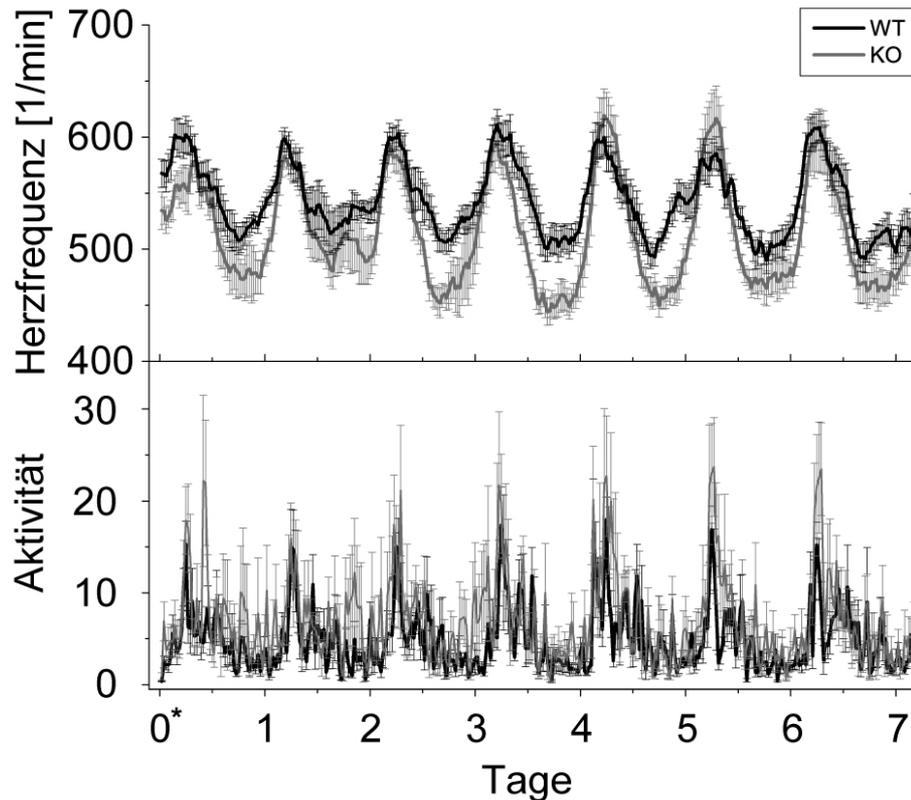


Abbildung 3-30 Die Abhängigkeit der Herzfrequenz von der Aktivität

(*) Die über sieben Tage verlaufende Messung wurde um 15 Uhr begonnen. Die Tiere wurden in einem 12 Stunden Tag/Nacht Zyklus gehalten. Horizontale Bewegungen der Maus werden durch die Empfängerplatte des EKG-Transponders als Aktivität gemessen.

Um einen ersten Überblick zu bekommen, wurde ein EKG über eine Woche durchgeführt. Bei jedem Tier (6 WT, 6 KO, littermatched, 2-6 Monate) wurden alle 30 Minuten für 20 Sekunden Aufzeichnungen durchgeführt. Die mittlere Herzfrequenz während der 20 Sekunden wurde bestimmt und mit der gleichzeitig aufgezeichneten Aktivität korreliert (Abbildung 3-30).

Die KO-Tiere zeigten während der Ruhephasen (tagsüber) eine deutlich erniedrigte Herzfrequenz. Waren die Tiere aktiv, war dieser Effekt nicht mehr zu beobachten.

Der Mittelwert der Frequenzen über den gesamten Messzeitraum war bei den KO-Tieren um ca. 5 % niedriger als bei den WT-Mäusen (515 +/- 9 vs. 544 +/- 8, $p = 0,04$, Abbildung 3-31 A). Der Frequenzunterschied war während der Ruhephasen deutlich ausgeprägter als bei hoher Aktivität (Abbildung 3-31 B). Bei sehr geringer Aktivität ($< 0,1$) betrug der Unterschied 15 % (484 +/- 10 (WT) vs. 410 +/- 15 (KO), $p = 0,002$), während bei hoher

Aktivität (> 20) keine signifikante Differenz mehr feststellbar war (617 +/- 21 (WT) vs. 641 +/- 20 (KO)).

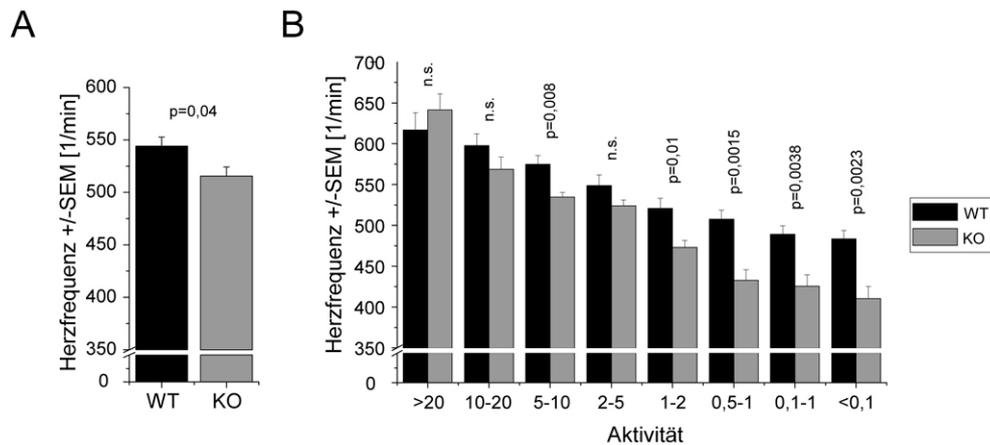


Abbildung 3-31 Herzfrequenzunterschiede zwischen WT und KO

(A) Mittelwerte der Herzfrequenzen über den gesamten Messzeitraum. (B) Abhängigkeit der Herzfrequenz von der Aktivität der Tiere. Signifikante p-Werte sind zu den einzelnen Aktivitätsklassen angegeben.

Ein weiterer Unterschied ergab sich bei der Betrachtung der Aktivität. Im Wochenverlauf (Abbildung 3-30) zeigte sich, dass die KO-Tiere während der eigentlichen Ruhephasen (tagsüber) eine erhöhte Aktivität zeigen. Die statistische Auswertung ergab, dass die WT-Mäuse ruhiger waren (Abbildung 3-32). In der Aktivitätsklasse von 2-4 waren sie 109 +/- 7 mal vertreten, die KO-Tiere 80 +/- 6 mal (p=0,01). In der Klasse von 0-2 war die n Zahl zu gering um signifikant zu werden, der Trend ist jedoch auch hier zu sehen. In den höheren Aktivitätsklassen war der umgekehrte Trend zu beobachten. Die KO-Tiere sind hier häufiger vertreten. Dies ist allerdings nicht signifikant. Bei Aktivitäten über 40 finden sich nur noch KO-Tiere.

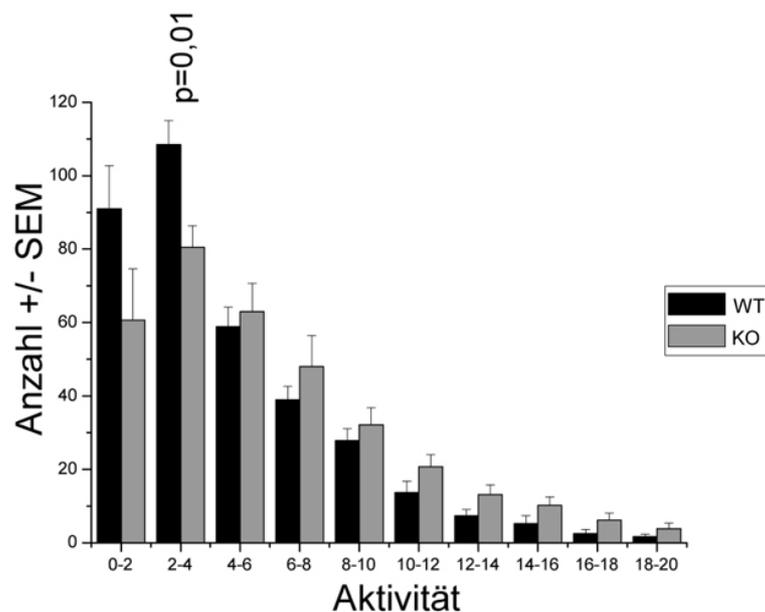


Abbildung 3-32 Aktivitätsunterschiede zwischen WT und KO

Verteilung der durchschnittlichen Aktivität der Tiere während des gesamten Meßzeitraumes von einer Woche. Die niedrigste Aktivität (0-2) wird von allen Tieren nur selten erreicht. Aus diesem Grund fällt die Kurve hier ab.

3.7.1.2 Repolarisation der Herzkammer

Neben den Veränderungen der Herzfrequenz und der Aktivität zeigte sich ein weiterer Phänotyp bei genauerer Betrachtung der elektrophysiologischen Abläufe während einzelner Erregungen (Abbildung 3-33 A).

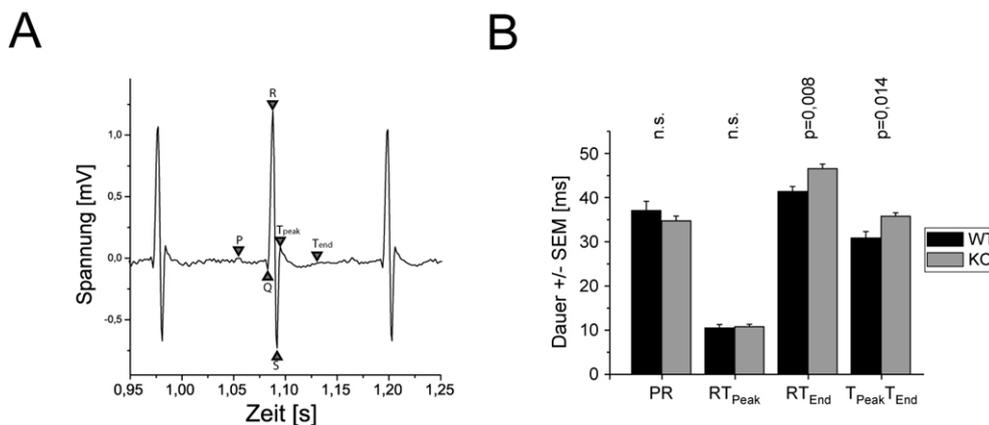


Abbildung 3-33 Vermessung der EKG Intervalle

(A) Beispiel EKG einer Maus, P Vorhoferregung, QRS Kammerkomplex, T_{Peak} / T_{End} Peak bzw. Ende der Kammerrepolarisation. (B) Statistische Auswertung relevanter Intervalle

Die Vermessung der einzelnen Intervalle ergab für die KO-Tiere eine signifikante Verlängerung der T-Welle von 16 % (Abbildung 3-33 B und Tabelle 3.7-1). Die T-Welle repräsentiert die Repolarisation der Herzkammer, die vor einer erneuten Erregung abgeschlossen sein muss. Die Dauer aller anderen Strecken (PR, QRS Komplex, PT_{Peak}) war dagegen nicht verändert.

Tabelle 3.7-1 Auswertung der EKG Intervalle

	WT	KO	Signifikanz
P-R	37,1 +/- 2,0	34,8 +/- 1,1	n.s.
R-T _{Peak}	10,5 +/- 0,8	10,8 +/- 0,5	n.s.
R-T _{End}	41,4 +/- 1,1	46,6 +/- 1,1	p=0,008
T _{Peak} -T _{End}	30,9 +/- 1,4	35,8 +/- 0,8	p=0,014

Diese Werte wurden für Frequenzen von 460 +/- 12 Schläge pro Minute berechnet. Bei hohen Frequenzen (705 +/- 5, nach Injektion von 1 mg/kg KG Adrenalin) war der Unterschied in der Dauer der T-Welle nicht mehr existent (Abbildung 3-34).

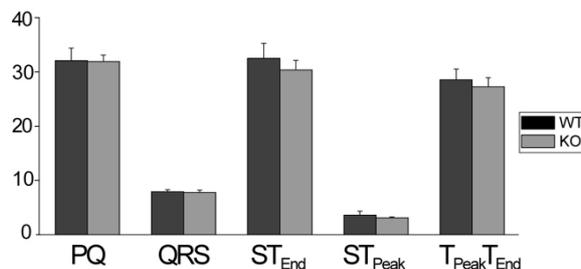


Abbildung 3-34 Intervalldauer bei hohen Herzfrequenzen (705 +/- 5 pro Minute)

P Vorhoferregung, QRS Kammerkomplex, T_{Peak} / T_{End} Peak bzw. Ende der Kammerrepolarisation

3.7.1.3 Pharmakologie

Es wurde getestet, ob die niedrigere basale Herzfrequenz der HCN3-KO-Mäuse durch Adrenalin auf ein mit WT-Tieren vergleichbares Niveau angehoben werden konnte, oder ob die Frequenz weiterhin reduziert blieb. Die Injektion wurde ungefähr in der Mitte der Ruhephase der Mäuse (ca. 12-15 Uhr) durchgeführt.

Die signifikant erniedrigte Frequenz der KO-Tiere (Abbildung 3-35 A und B) wurde durch die Injektion von Adrenalin (0,66 µg/g KG) auf den gleichen Wert angehoben wie bei den WT-Mäusen (Tabelle 3.7-2). Die Frequenzänderung war bei beiden Gruppen hoch signifikant (WT p=0,0035 und KO p=0,00002)

Tabelle 3.7-2 Herzfrequenzen vor und nach Adrenalin (0,66 µg/g KG)

	vor Injektion	nach Injektion	Differenz
WT	535 +/- 18	616 +/- 11	81 +/- 25
KO	437 +/- 5	603 +/- 17	166 +/- 20

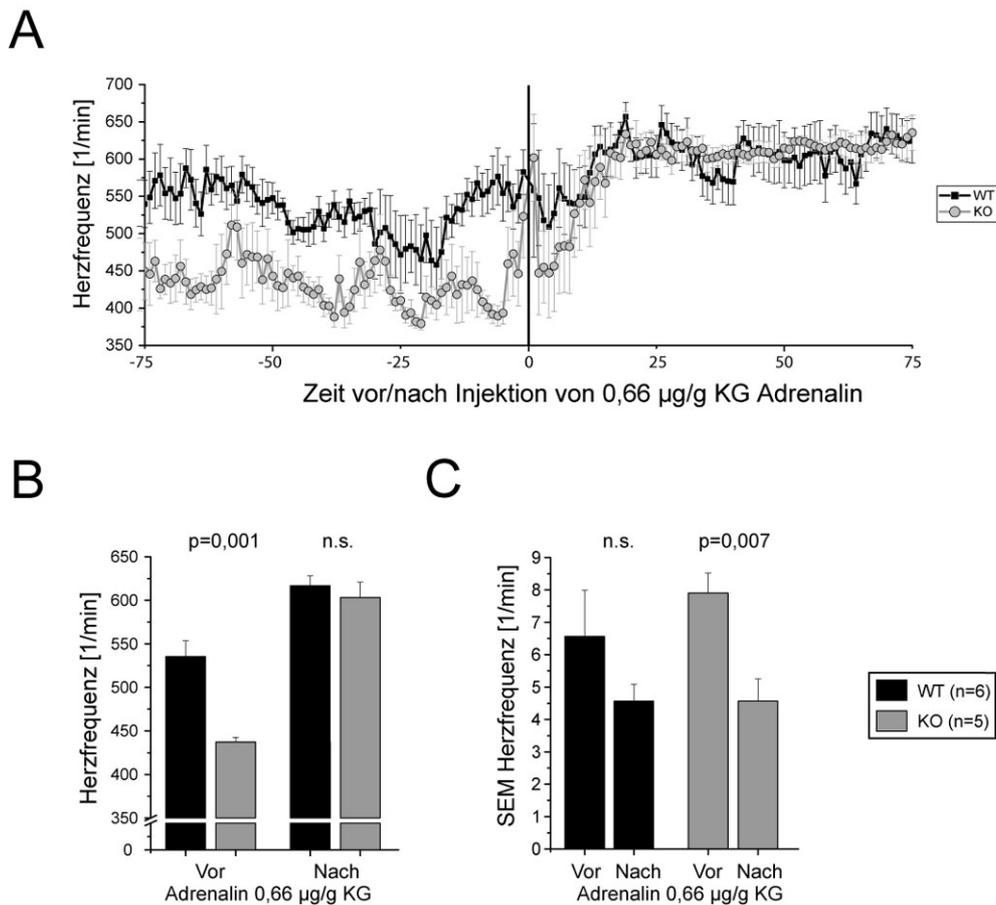


Abbildung 3-35 Vergleich der Herzfrequenzen von WT und KO bei Injektion von Adrenalin

(A) Die Herzfrequenzen wurden 75 Minuten vor bis 75 Minuten nach der Injektion ($t = 0$ min) von 0,66 µg/g KG Adrenalin gemessen (WT $n=6$, KO $n=5$) (B) Erhöhung der Herzfrequenz durch Adrenalin, (Frequenz \pm SEM). (C) Veränderung der Frequenzvariabilität durch die Adrenalin-induzierte Tachykardie (Variabilität \pm SEM).

3.7.2 Isolierte Sinusknoten-Vorhof-Präparate

Da HCN3 sowohl im Ventrikel (3.5.2 und 3.4.2.2) als auch im Vorhof (3.5.2) nachgewiesen werden konnte und die Ruhefrequenz bei den KO-Tieren erniedrigt war, stellte sich die Frage, ob die HCN3-Defizienz auch im isolierten Herzen einen Einfluss auf die Frequenz hat. Um dies zu untersuchen, wurde der Sinusknoten mit dem rechten Vorhof isoliert und dessen Eigenfrequenz bestimmt (2.11.2). Durch die Isolation wurden zentralnervöse Wirkungen beseitigt.

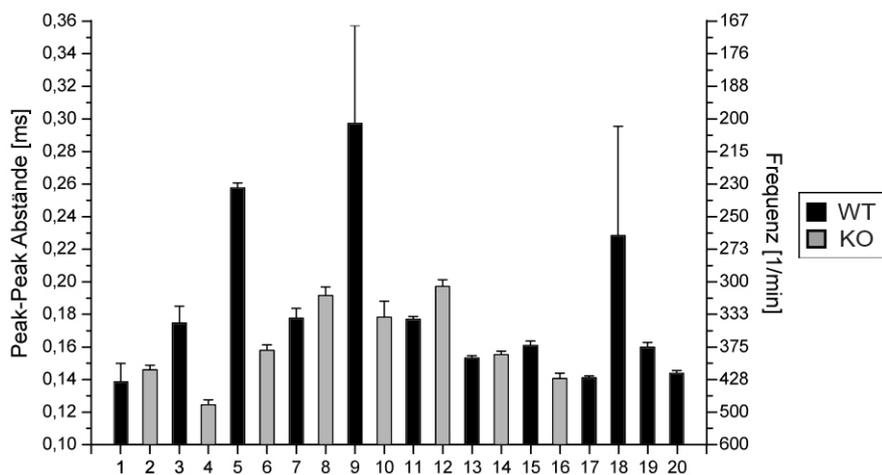


Abbildung 3-36 Frequenzen der isolierten Sinusknoten-Vorhof-Präparate

Parallel zu den 8 KO-Präparaten wurde immer jeweils ein WT-Präparat gemessen. Die WT-Präparate 5, 9 und 18 wurden aufgrund ihrer extremen Bradykardie und Arrhythmie aus der Auswertung ausgeschlossen.

Es ergab sich praktisch keine Differenz zwischen WT und KO. Die Mittelwerte der Frequenzen aller Tiere waren $381,5 \pm 12,5$ vs. $379,8 \pm 21,4$ pro Minute für WT bzw. KO (\pm SEM). Auch die Frequenzvariabilität (ausgedrückt durch die Standardabweichung) war nicht signifikant unterschiedlich.

4. Diskussion

4.1 Vektorkonstruktion, Targeting und Erzeugung der Mauslinien

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Erstellung einer HCN3-defizienten Mauslinie mittels gene targeting. Hierfür musste als erstes die genomische Struktur des murinen HCN3-Lokus aufgeklärt werden, da zum Zeitpunkt der Erstellung die genomische Sequenz der Maus noch nicht bekannt war. Einen ersten Anhaltspunkt gab die bereits veröffentlichte Struktur des humanen HCN3-Lokus. Es erwies sich, dass die Organisation des murinen Locus der des humanen entsprach (Abbildung 3-1). Die relativ kurzen Introns zwischen Exon 2 und 8 konnten problemlos sequenziert werden. Dies war für das ca. 7 kb lange Intron 1 jedoch nicht möglich. Um die benötigten Informationen über die vorhandenen Schnittstellen zu erhalten, wurde eine Restriktionskartierung durchgeführt (Abbildung 3-1). Die aufgestellte Karte wurde nachträglich mit der veröffentlichten Mausequenz verglichen. Dabei ergaben sich nur geringfügige Unterschiede in der Position der Restriktionsstellen.

Anhand der aufgeklärten Struktur des Genlokus wurde die Strategie zur Deletion von HCN3 erstellt. Der Vektor sollte gleichzeitig die Erzeugung einer konstitutiven und einer konditionalen KO-Mauslinie erlauben. Dazu ist es notwendig, nach erfolgter homologer Rekombination die Selektionskassette wieder zu entfernen, da sonst eine ungestörte Funktion des geflochtenen Gens nicht möglich ist. Auch beim konstitutiven Knockout ist es von Vorteil, den Selektionsmarker zu entfernen. Andernfalls besteht die Möglichkeit, dass er den Phänotyp beeinflusst (Rajewsky, Gu et al. 1996). Die gewählte Strategie mit dem geflochtenen Exon 2 und der ebenfalls geflochtenen Selektionskassette hatte die gewünschten Eigenschaften (Abbildung 3-2).

Nach dem ersten Targeting wurden 384 ES-Klone gescreent. Die korrekte Integration nach homologer Rekombination konnte in allen durchgeführten Tests bei 7 Klonen nachgewiesen werden (entspricht 1,8 %). Zwei ES-Klone wurden ausgewählt, um im zweiten Targeting durch Cre-vermittelte Rekombination den Selektionsmarker zu deletieren (konditionale ES-Klone) bzw. zusätzlich das Exon 2 (konstitutive KO-Klone). Es wurden Primärklone gewählt, die an zwei verschiedenen Tagen isoliert wurden. Dies sollte verhindern, dass ein eventuelles Problem an einem Tag nicht dazu führt, dass die Stammzellen später nicht mehr pluripotent sind. Die beiden aufgetauten ES-Zellklone wurden mit der Cre-Rekombinase transfiziert. Aufgrund der bekannten hohen Effizienz der Cre-Rekombinase wurden in diesem Schritt wesentlich weniger Klone isoliert und gescreent. Von 78 getesteten Klonen besaßen 13 das KO-Allel und einer das konditionale. Dies weist auf die Effektivität der Cre Rekombinase hin, da die konditionalen KO-Klone ebenfalls zu KO-Klonen rekombiniert werden können. Eine mögliche Erklärung für die restlichen 64 Klone, die im Southern Blot nur eine WT-Bande zeigten (Abbildung 3-11 B, Klon 4/7) ist, dass in der Umgebung isolierter, G-418-resistenter ES-Zellklone WT-Zellen überlebt hatten, die dann im zweiten Targeting ungehindert wachsen konnten.

Zusätzlich zu drei totalen KO-Klonen, dem konditionalen KO-Klon und einem Klon aus dem ersten Targeting wurde noch ein HCN3/lacZ-Klon (von Dr. Angela Schneider) in Blastozysten injiziert. Sämtliche erhaltenen Chimären wurden verpaart und deren Nachkommen auf Keimbahngängigkeit der Mutationen überprüft. Aus allen ES-Zelllinien wurden die entsprechenden Mauslinien erhalten.

Tiere mit einer homozygoten Deletion von HCN3 (sowohl die KO-Linie als auch die HCN3/lacZ-Linie) zeigten initial keinerlei auffällige Veränderungen. Größe, Gewicht und Fertilität unterschieden sich nicht von WT-Tieren. Heterozygote Verpaarungen brachten Nachkommen mit Mendelscher Verteilung hervor.

4.2 Lokalisation von HCN3

Die Aufklärung der Gewebsverteilung von HCN3 erwies sich als kompliziert. Es wurde schon gezeigt, dass die Expression von HCN3 gering ist (Moosmang, Biel et al. 1999; Moosmang, Stieber et al. 2001; Notomi und Shigemoto 2004). Im besonders interessanten neuronalen Gewebe wurde ein mögliches spezifisches Signal des selbst erstellten anti-HCN3-Antikörpers von einer starken unspezifischen Färbung verdeckt. Durch Western Blots ließ sich dieses Problem nicht umgehen, da Subpopulationen von Neuronen in bestimmten Hirnregionen untersucht werden mussten. Interessanterweise wurden mit Antikörpern anderer Arbeitsgruppen in Neuronen die gleichen Ergebnisse erhalten. Weder der monoklonale Antikörper aus der Ratte (Müller, Scholten et al. 2003) noch ein weiterer Antikörper aus Kaninchen (Shigemoto) war in der Lage, im WT ein im Vergleich zum KO spezifisches Signal in Neuronen zu zeigen.

Die Veröffentlichung der Verteilung von HCN-Kanälen in der Retina (Müller, Scholten et al. 2003) läßt ein großes Problem der Immunhistochemie erkennen. Der dort verwendete Antikörper erwies sich in der Immunhistochemie als nicht spezifisch für HCN3, die beschriebene Lokalisation von HCN3 in den Endfüßen der Photorezeptoren ist nicht haltbar, da das entsprechende Signal auch im KO nachzuweisen war. Ohne die Bestätigung über ein KO-Modell kann die Spezifität nicht völlig gesichert werden.

Die Verwendung unseres eigenen anti-HCN3-Antikörpers erbrachte ein anderes Bild, das von Dr. Frank Müller (Institut für biologische Informationsverarbeitung, Jülich) bestätigt werden konnte (persönliche Kommunikation). Danach zeigte sich ein Signal in der inneren plexiformen Schicht. Die Abwesenheit von HCN3 in diesem Bereich hatte allerdings keinerlei Auswirkungen auf das Elektroretinogramm der HCN3-KO-Tiere, welches an der Augenklinik Tübingen (Forschungsgruppe retinale Funktionsdiagnostik, PD Dr. Mathias Seeliger, Daten nicht gezeigt) durchgeführt wurde. Bei diesen Untersuchungen wird die elektrische Antwort der retinalen Neuronen auf verschiedene Lichtreize hin gemessen. Dieses Verfahren misst die globale elektrische Reaktion der Retina und ist relativ insensitiv gegenüber Veränderungen von Strömen, die nur in einer kleinen Zellpopulation exprimiert werden.

Alle drei verwendeten Antikörper sind gegen C-terminale Epitope gerichtet. Das legt die Vermutung nahe, dass sich in diesem Bereich ein antigenes Peptid befindet, das in weiteren neuronalen Proteinen vorhanden sein könnte. Die These wird dadurch gestützt, dass die

Antikörper von verschiedenen Spezies (Ratte und Kaninchen) stammen. Dagegen spricht allerdings, dass sich die zur Immunisierung verwendeten peptidischen Antigene von Müller und Shigemoto unterscheiden. Außerdem erbrachte ein Vergleich der Aminosäuresequenz des C-Terminus mit Datenbanken keine weiteren zu HCN3 homologen Sequenzen.

Im Moment versuchen wir auf zwei Wegen, die Spezifität unseres Antikörpers zu erhöhen. Durch Präabsorption des Antikörpergemisches an Gehirngewebe einer KO-Maus vor der eigentlichen Verwendung sollen sämtliche unspezifische Antikörper entfernt werden. Ein anderer Weg, den wir erproben möchten, ist die Identifikation eines einzelnen HCN3-spezifischen Epitops des C-Terminus und die Synthese des entsprechenden Peptids. Mit diesem soll anschließend ein praktisch „monoklonaler“, HCN3-spezifischer Antikörper aus dem vorliegenden Gemisch extrahiert werden.

Um die beschriebenen Probleme mit den Antikörpern zu umgehen, wurde die HCN3/ β Gal-Mauslinie verwendet. Die aus den Chimären hervorgegangenen HCN3/lacZ-Tiere wurden mit einer CMV-Cre-Mauslinie verkreuzt. Dadurch wurde die noch vorhandene Selektionskassette entfernt und infolgedessen die β -Galactosidase-Transkription ermöglicht (Abbildung 3-15).

Eine direkte Färbung durch die Aktivität der β -Galactosidase mit XGal war bisher nur im olfaktorischen Epithel erfolgreich. Die Expression von HCN3 scheint hier sehr starker regionaler Kontrolle zu unterliegen. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die Verteilung der anderen HCN-Isoformen im olfaktorischen Epithel zu untersuchen.

Weder im Gehirn noch im Herzen konnte eine spezifische X-Gal-Färbung beobachtet werden. Während der Versuche im olfaktorischen Epithel hatte sich gezeigt, dass der Erfolg der Färbung sehr von den gewählten Bedingungen abhängt. Eine Färbung wurde erst beobachtet, nachdem allen Puffern Magnesiumchlorid (während der Fixierung und beim Waschen) zugesetzt wurde. Während der Färbung waren die Zusätze der beiden verwendeten Detergentien ebenfalls entscheidend.

Die Anwesenheit des Reporters β -Galactosidase konnte im Herzen jedoch durch Antikörper bestätigt werden. Das Enzym konnte in jeder Zelle des Ventrikels nachgewiesen werden. Auch im Atrium des Herzens wurde der Reporter gefunden. Hier ist das stärkste Signal an den endo- und epikardialen Oberflächen zu beobachten. Allerdings lässt sich über die Verwendung des Reporters nicht die subzelluläre Verteilung bestimmen, da die β -Galactosidase im Gegensatz zum HCN3-Kanal ein zytoplasmatisches Protein ist.

Im Gehirn erwies sich die Methode als nicht praktikabel, da der verwendete primäre Antikörper murinen Ursprungs ist. Dies führt vermutlich durch die große Anzahl von Immunzellen in diesem Gewebe zur Detektion von murinen Immunglobulinen durch den sekundären anti-Maus-Antikörper. Dadurch wird ein mögliches spezifisches Signal überdeckt. Zwei getestete Antikörper aus Kaninchen zeigten leider eine gleichartige Färbung sowohl des HCN3/ β Gal- als auch des WT-Gehirngewebes.

4.3 Verhaltensversuche

Der Erfolg der Verhaltensversuche hängt von vielen Faktoren ab. So müssen alle Tiere unter den gleichen Bedingungen gehalten werden. Eine individuelle Entwicklung kann zu stark differierenden Leistungen führen. Ein weiterer wichtiger Faktor ist der genetische Hintergrund. Zum Beispiel schneiden Tiere vom Stamm Sv129 im Water maze schlechter ab als C57/Bl6 (Crawley, Belknap et al. 1997). Daher sollte der genetische Hintergrund entsprechend dem Versuch gewählt werden. Wird beispielsweise eine Verminderung der Leistung erwartet, könnte es durch die Wahl von Sv129 Mäusen schwierig werden, einen statistisch signifikanten Unterschied zu zeigen.

Ein allgemein anerkannter Punkt ist, dass für Verhaltensversuche Geschwisterpaare verwendet werden sollen. Sie erfüllen die Forderungen, vor allem, wenn kein reiner genetischer Hintergrund vorhanden ist, wie es bei den HCN3 Mäusen der Fall war. Die Rückkreuzung auf C57/Bl6 befand sich zum Zeitpunkt der Versuche in der fünften Generation. Von einem reinen Hintergrund geht man ab der zehnten Generation der Rückkreuzung aus (Markel, Shu et al. 1997).

Die ersten vier Versuche (Morris Water maze, Open Field, Dark-Light-Transition und Rotarod) stellen rein orientierende Versuche dar, die allgemein bei KO Linien durchgeführt werden, bei denen ein neuronaler Phänotyp erwartet wird. Dies war bei HCN3 aufgrund von Western Blots und der RT-PCR der Fall.

Bei allen vier Experimenten zeigten die KO-Tiere keine auffälligen Leistungsunterschiede, die auf eine Veränderung ihres Verhaltens hätten schließen lassen können. Mit dem Morris Water maze wurde die Fähigkeit der Maus getestet, sich anhand des Raumes zu orientieren. Der Test kann einen Hinweis auf Veränderungen des Hippocampus geben. Im Open Field Test wurden das explorative Verhalten und die spontane Aktivität der Mäuse untersucht. Der nächste Versuch, der Dark-Light-Transition Test, wurde benutzt, um mögliche Unterschiede im Angstverhalten aufzudecken. Das Rotarod schließlich diente der Untersuchung der motorischen Koordination, die Anhaltspunkte auf Veränderungen im Cerebellum geben kann.

Das letzte Experiment, der Geruchsaversionstest, wurde aufgrund einer Beobachtung durchgeführt, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Hatt am Lehrstuhl für Zellphysiologie in Bochum gemacht wurde. Dort wurden an jeweils 4 WT- und KO-Mäusen Elektroolfaktogramme (Methode siehe Spehr, Wetzell et al. 2002) gemessen. Hierbei wird die Antwort der olfaktorischen Neuronen zwischen einem Einzelduft (Octanal) mit einem Duftgemisch (Henkel 100, 100 verschiedenen Duftstoffe) verglichen. Dabei ergab sich eine 1,7-fach höhere Signalverstärkung bei den HCN3-KO-Tieren im Vergleich zu WT-Mäusen (jeweils $n=4$, $p<0,05$). Diese wurde jedoch nur bei einem länger andauernden Duftpuls beobachtet. Eine mögliche Interpretation wäre, dass die Adaption an den Geruch bei den KO-Tieren reduziert ist. Der Mechanismus entspräche dem, der für HCN1 in der Retina beschrieben wurde (1.1.4): Durch I_h wird das Niveau des Ruhemembranpotentials und damit die Erregbarkeit des Neurons reguliert. Dies wurde auch für olfaktorische Rezeptorneuronen postuliert (Vargas und Lucero 1999; Lynch und Barry 1991).

Der Geruchsaversionstest sollte eine mögliche veränderte Sensitivität bei den KO-Tieren belegen. Dies gelang jedoch nicht. Es konnte zwar ein Trend beobachtet werden (Abbildung 3-29), allerdings nur bei einer bestimmten Konzentration. Möglicherweise war der für den Versuch gewählte Konzentrationsbereich nicht geeignet.

4.4 Kardiologische Experimente

Bis vor kurzem wurde angenommen, dass HCN3 im Herzen nicht exprimiert wird. Erst während der Untersuchung HCN4-defizienter Embryonen wurde RNS für HCN3 nachgewiesen (Stieber, Herrmann et al. 2003). Eigene Versuche an erwachsenen WT- und KO-Tieren bestätigten dies (3.4.2.2 und 3.5.2). Daraufhin wurden EKGs gemessen. Das zur Übersicht erstellte Langzeit-EKG über eine Woche zeigte eine deutliche Reduktion der basalen Herzfrequenz während der Ruhephasen der Tiere. Bei Aktivität war keine Differenz mehr auszumachen. Tatsächlich erwies sich der Frequenzunterschied als abhängig von der Aktivität (Abbildung 3-31). Mit steigender Aktivität nimmt die Herzfrequenz der KO-Tiere stärker zu als die der WT-Mäuse. Im höchsten bestimmten Aktivitätsbereich sieht es sogar danach aus, als hätten die KO-Tiere die Tendenz, höhere Frequenzen zu erreichen. Dies könnte allerdings auch daran liegen, dass Tiere dieser Gruppe auch aktiver sein können als die WT-Mäuse (3.7.1.1). Eine weitere Beobachtung war, dass die KO-Tiere in den Ruhephasen häufiger eine erhöhte Aktivität zeigen, im Langzeit-EKG sind häufige Aktivitätspeaks zu erkennen. Die statistische Auswertung belegt dies, die KO-Tiere weisen wesentlich seltener eine niedrige Aktivität auf. Zusammengefasst legen diese Ergebnisse die Vermutung nahe, dass es sich um einen zentralen Effekt handelt, der möglicherweise durch Veränderungen des Sympathikus- oder Parasympathikustonus ausgelöst wird. Zu diesem Zweck werden derzeit von Dr. Stylianos Michalakis elektrophysiologische Untersuchungen an parvozellulären Neuronen des periventriculären Nukleus im Hypothalamus durchgeführt. Diese Neuronen sind an der Steuerung der Aktivität des autonomen Nervensystems beteiligt und exprimieren HCN3 (Notomi und Shigemoto 2004). Weitere geplante Experimente sind Elektroenzephalogramme an HCN3-KO-Tieren. Diese werden in den nächsten Monaten in Kooperation mit der Universität Tübingen durchgeführt. Diese Experimente werden die beobachteten Unterschiede in der Aktivität sicher genauer definieren können.

Der zuvor durchgeführte Open Field Test konnte die beobachtete Aktivitätsveränderung in der Ruhephase nicht aufdecken, da der Test während der aktiven Phase durchgeführt wurde. Eine Wiederholung des Versuchs in der Ruhephase würde vermutlich keine Aufschlüsse geben, da alle Tiere durch die Manipulation aufgeregt und geweckt würden. Um mit diesem System Unterschiede aufzuzeigen, müsste jedes Tier für mindestens 24 Stunden einzeln im Testfeld gehalten werden.

Der Unterschied der basalen Herzfrequenz konnte auch eindrucksvoll durch die Adrenalin-induzierte Tachykardie bei ruhenden Tieren gezeigt werden. Während sich die Frequenzen vor der Injektion zwischen den Gruppen deutlich unterschieden, war danach die erreichte Frequenz praktisch gleich. Ein auffälliger Unterschied war zudem die Frequenzvariabilität vor der Applikation von Adrenalin. Nach der Injektion wurde die Variabilität bei den KO-Tieren signifikant reduziert.

Um die Vermutung zu bestätigen, dass die Aktivität und die geringere Ruhfrequenz zentral gesteuert und nicht im Herzen angelegt sind, wurden Versuche an isolierten Organen durchgeführt. Die von zentralnervöser Regulation befreiten Sinusknoten-Vorhofpräparate sollten dann theoretisch in gleicher Frequenz schlagen. Dies konnte bestätigt werden. Allerdings ist die Frequenzvariabilität der isolierten Organe relativ hoch, so dass die Aussagekraft des Experiments vorsichtig zu bewerten ist.

Interessanterweise scheinen sich die höhere Aktivität in Ruhe und die gleichzeitig reduzierte basale Herzfrequenz zu widersprechen.

Ein weiterer Effekt der Deletion von HCN3 konnte bei der genaueren Analyse der einzelnen EKGs nachgewiesen werden. Die Repolarisation der Kammer war signifikant verlängert, wenn die Tiere ruhten. Dies könnte auf eine Bedeutung von HCN3 bei der Wiederherstellung des Ruhemembranpotentials nach einem erfolgten Aktionspotential hindeuten. Dafür spricht auch, dass HCN3 in allen Kardiomyozyten immunhistochemisch nachgewiesen werden konnte. Der Effekt ist allerdings bei hohen Frequenzen nicht mehr messbar. Die Repolarisationsdauer verkürzt sich hier auf einen Wert, der dem bei den WT-Mäusen entspricht. Eine erhöhte Zahl an Arrhythmien wurde nicht beobachtet, der Abstand des Endes der T-Welle zum nächsten Kammerkomplex ist immer noch ausreichend groß. Zur eingehenden Untersuchung dieses Phänotyps sind elektrophysiologische Versuche (patch-clamp) an isolierten Kardiomyozyten geplant.

Die vorliegende Arbeit hat einige neue Fragen bezüglich der Bedeutung und Funktion von HCN3 aufgeworfen.

- HCN3 scheint in der Regulation des autonomen Nervensystems eine Rolle zu spielen. Erkenntnisse können hier durch die elektrophysiologischen Experimente am periventriculären Nukleus und durch das EEG gewonnen werden.
- HCN3 ist sowohl im olfaktorischen Epithel als auch im olfaktorischen Bulbus exprimiert. Interessanterweise ist die Verteilung im Epithel regional begrenzt. Die tatsächliche Funktion in diesen Geweben ist noch zu klären.
- Eine offene Frage ist, ob HCN-Kanäle Redundanz zeigen. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass beim HCN1-KO die Expression von HCN3 erhöht war (Nolan, Malleret et al. 2003). Aufschluss können hier Kreuzungsexperimente mit den anderen HCN-KO-Mauslinien geben.

5. Zusammenfassung

Die Bedeutung des Hyperpolarisations-aktivierten Stromes wurde in zahlreichen Arbeiten belegt (Übersichtsarbeiten Biel, Schneider et al. 2002; Robinson und Siegelbaum 2003). Für viele rhythmisch verlaufende Prozesse im Organismus ist dieser Strom unentbehrlich. Auch andere bedeutende Funktionen wie die Modulation des Niveaus des Ruhemembranspotentials wurden beschrieben. Die molekularen Korrelate sind die Hyperpolarisations-aktivierten, Zyklonukleotid-gesteuerten Kationenkanäle, kurz HCN-Kanäle. Die Familie umfasst vier Isoformen, HCN1-4. Für HCN1, 2 und 4 existieren zahlreiche Berichte über ihre elektrophysiologischen Eigenschaften und inzwischen auch die entsprechenden KO-Modelle (HCN1 (Nolan, Malleret et al. 2003), HCN2 (Ludwig, Budde et al. 2003) und HCN4 (Stieber, Herrmann et al. 2003)).

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Erstellung einer HCN3-defizienten Mauslinie, um das Expressionsmuster und die physiologische Bedeutung von HCN3 aufklären zu können. Um im Falle eines letalen Phänotyps durch eine essentielle entwicklungsphysiologische Funktion von HCN3 weitere Funktionen in anderen Organen untersuchen zu können, wurde zusätzlich eine konditionale Mauslinie erstellt.

HCN3 konnte bislang in der Retina, im Gehirn, im olfaktorischen Epithel und im Herzen nachgewiesen werden. Bisher konnte nur ein kardialer Phänotyp belegt werden. Mögliche Unterschiede in der Geruchswahrnehmung müssen noch eingehender analysiert werden. Die Verhaltensversuche erbrachten keine auffälligen Veränderungen im Verhalten der Tiere. Die fehlende Expression in anderen Organen als dem Herz hat keine offensichtlichen Auswirkungen, ohne detailliertere Untersuchungen ist nichts feststellbar. Dies ist allgemein bei den meisten KO-Linien der Fall, so dass mit Sicherheit noch einige interessante Funktionen entdeckt werden können.

Bei den kardiologischen Untersuchungen wurden zwei verschiedene Aspekte festgestellt. Als erstes wurden die geringere basale Herzfrequenz und gleichzeitig eine erhöhte Aktivität festgestellt. Dieser Phänotyp scheint eher zentralnervösen Ursprungs zu sein. Der zweite entdeckte Aspekt ist die durch die Deletion verlängerte Repolarisationszeit des Ventrikels. Es sind noch weitere, detailliertere Experimente nötig, um die physiologische Bedeutung aufzuklären. Von Interesse ist hier die elektrophysiologische Untersuchung der Aktionspotentiale der HCN3-defizienten Kardiomyozyten, die Aufklärung der Beteiligung von HCN3 an zentralnervösen Vorgängen, möglicherweise an der Steuerung des Tonus von Sympathikus bzw. Parasympathikus oder zentraler Hormonsekretion.

6. Anhang

6.1 Verwendete Primer

Name	Sequenz	
Primer zur Erstellung der Sonden für Southern Blots		
RM1F	tac acc gtg gtt atc cgg cct	für Sonde H (mit E8R)
RM2R	aac tgg tgt ccc tcg ctc tcc	für Sonde V (mit E1bF)
E8R	cgt gca cca gtg gtt ccc aca	Sonde H
E1bF	cgg cct cag gtg ggg tgc cgg	Sonde V
Primer zur Konstruktion des Targetingvektors		
RM3F	tcg agc ctg agg cta gta g	Linker mit XhoI, Bsu36I und Acc65I, 5'P
RM4R	gta cct act agc ctc agg c	Linker mit XhoI, Bsu36I und Acc65I, 5'P
RM5F	ggc cgc ctg agg gaa tct cat atg gcg cgc cg	Linker mit NotI, Bsu36I, NdeI, AscI und BamHI, 5'P
RM6R	gat ccg gcg cgc cat atg aga ttc cct cag gc	Linker mit NotI, Bsu36I, NdeI, AscI und BamHI, 5'P
RM7F	ata aga atg cgg ccg cta aac tag gcg cgc cat aac ttc gta taa tgt atg cta tac gaa gtt att cca aca aca cca ttg gtt gtt	zur PCR des Exons 2 mit loxP, NotI und AscI
RM8R	atc gcg gat ccg tgc aca tct tcc cca ccc cat gga a	zur PCR des Exons 2 mit ApaLI und BamHI
Genotypisierungsprimer		
RM15F	gct cta gat ttg ccc aac cta	Genotypisierung KO-Allel
RM27R	agc ctc agg ctc gag gtc g	Genotypisierung flox-Allel
A66F	gag cca cga cta gat gct ga	Genotypisierung WT-Allel
A54F	agt tgt ggt ttg tcc aaa ctc	Genotypisierung HCN3/lacZ-Allel
RM13R	aca ccg tct gaa ctg ata aga	Genotypisierung WT, KO, flox und HCN3/lacZ-Allel
A71F	ggg gac gtg gtt ttc ctt tg	Genotypisierung HCN3/lacZ-Allel (Exzision der neo-Kassette)
A69R	ttt tcc cag tca cga cgt tgt	Genotypisierung HCN3/lacZ-Allel (Exzision der neo-Kassette)
A63R	act gcc ttg gga aaa gcg cc	Genotypisierung HCN3/lacZ-Allel (Exzision der neo-Kassette)
CreFwd	gct gcc acg acc aag tga cag caa tg	Genotypisierung Cre Rekombinase
CreRev	gta gtt att cgg atc atc agc tac ac	Genotypisierung Cre Rekombinase

Primer zur Erstellung der Antigenkonstrukte		
RM18F	cgc gga tcc ata ctg cag cgg aaa cgc tct	mit BamHI für Antigenkonstrukte I + II
RM19R	ccc aag ctt cac atg ttg gca gaa att tgg	mit HindIII für Antigenkonstrukte I + III
RM20R	ccc aag ctt agg agg gtg gct gga gaa tc	mit HindIII für Antigenkonstrukt II
RM21F	cgc gga tcc gct cga tct gct aga cgc tca	mit BamHI für Antigenkonstrukt III
RM22F	cgc gga tcc atc atg gag gag gag gcg cg	mit BamHI für Antigenkonstrukt IV
RM23R	ccc aag ctt gtg gct gcc gaa gac ccg	mit HindIII für Antigenkonstrukt IV
Primer für die Sequenzierung der Antigenkonstrukte		
RM16F	cgg ata aca att tca cac ag	pQE30 Sequencing
RM25R	gtt ctg agg tca tta ctg g	pQE30 Sequencing
Primer für die Selektionskassette		
V3F	ccc tac ccg gta gaa ttg acc	auf neo-Gen in Richtung der 2. loxP
V2R	gag atc agc agc ctc tgt tcc	auf tk-Gen in Richtung der 3. loxP
Primer für die HCN3 RT-PCR		
E2R	cct ccc act ggt gta tgt agc	Primer für RT-PCR
E3R	cat gga gac cca gca gtc gga	Primer für RT-PCR
A28F	gtc cgc cgg ggc ctg gat	Primer für RT-PCR

6.2 Antikörper

6.2.1 Primäre Antikörper

Antikörper	aus Spezies	Konzentration	Hersteller
anti-HCN3	Kaninchen	1:100 – 1:500 (IHC) 1:1000 (WB – AK) 1:5000 (WB - Serum)	eigen
anti-HCN3	Kaninchen	1:500 (WB)	Shigemoto
anti-RGS-HIS	Maus	1:2000 (WB)	Quiagen
anti-β-galactosidase	Maus	1:1000 (IHC)	Promega

6.2.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	aus Spezies	Konjugat	Konzentration	Hersteller
anti-rabbit	Ziege	Alexa 546	1:800	MoBiTec
anti-rabbit	Esel	Peroxidase	1:2000	Amersham
anti-rabbit	Esel	FITC	1:200	Dianova
anti-mouse	Ziege	Biotin	1:200	Dianova
anti-mouse	Ziege	Alexa 594	1:200	MoBiTec

7. Literaturverzeichnis

- Arns, M., Sauvage, M. und Steckler, T. (1999). "Excitotoxic hippocampal lesions disrupt allocentric spatial learning in mice: effects of strain and task demands." *Behav Brain Res* **106**(1-2): 151-64.
- Bader, C. R., Macleish, P. R. und Schwartz, E. A. (1979). "A voltage-clamp study of the light response in solitary rods of the tiger salamander." *J Physiol* **296**: 1-26.
- Biel, M., Schneider, A. und Wahl, C. (2002). "Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation." *Trends Cardiovasc Med* **12**(5): 206-12.
- Biel, M., Seeliger, M., Pfeifer, A., Kohler, K., Gerstner, A., Ludwig, A., Jaissle, G., Fauser, S., Zrenner, E. und Hofmann, F. (1999). "Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(13): 7553-7.
- Biel, M., Zong, X. und Hofmann, F. (1999). "Cyclic nucleotide gated channels." *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **33**: 231-50.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-23.
- Bois, P., Bescond, J., Renaudon, B. und Lenfant, J. (1996). "Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells." *Br J Pharmacol* **118**(4): 1051-7.
- Brown, H. F., DiFrancesco, D. und Noble, S. J. (1979). "How does adrenaline accelerate the heart?" *Nature* **280**(5719): 235-6.
- Capecchi, M. R. (1989). "Altering the genome by homologous recombination." *Science* **244**(4910): 1288-92.
- Carter, R. J., Lione, L. A., Humby, T., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G. P., Dunnett, S. B. und Morton, A. J. (1999). "Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation." *J Neurosci* **19**(8): 3248-57.
- Cerbai, E., Barbieri, M. und Mugelli, A. (1994). "Characterization of the hyperpolarization-activated current, I(f), in ventricular myocytes isolated from hypertensive rats." *J Physiol* **481** (Pt 3): 585-91.
- Cerbai, E., Crucitti, A., Sartiani, L., De Paoli, P., Pino, R., Rodriguez, M. L., Gensini, G. und Mugelli, A. (2000). "Long-term treatment of spontaneously hypertensive rats with losartan and electrophysiological remodeling of cardiac myocytes." *Cardiovasc Res* **45**(2): 388-96.
- Cerbai, E., Pino, R., Porciatti, F., Sani, G., Toscano, M., Maccherini, M., Giunti, G. und Mugelli, A. (1997). "Characterization of the hyperpolarization-activated current, I(f), in ventricular myocytes from human failing heart." *Circulation* **95**(3): 568-71.

- Cerbai, E., Sartiani, L., DePaoli, P., Pino, R., Maccherini, M., Bizzarri, F., DiCiolla, F., Davoli, G., Sani, G. und Mugelli, A. (2001). "The properties of the pacemaker current I(F) in human ventricular myocytes are modulated by cardiac disease." *J Mol Cell Cardiol* **33**(3): 441-8.
- Chaplan, S. R., Guo, H. Q., Lee, D. H., Luo, L., Liu, C., Kuei, C., Velumian, A. A., Butler, M. P., Brown, S. M. und Dubin, A. E. (2003). "Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain." *J Neurosci* **23**(4): 1169-78.
- Chen, S., Wang, J. und Siegelbaum, S. A. (2001). "Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide." *J Gen Physiol* **117**(5): 491-504.
- Crawley, J. und Goodwin, F. K. (1980). "Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines." *Pharmacol Biochem Behav* **13**(2): 167-70.
- Crawley, J. N., Belknap, J. K., Collins, A., Crabbe, J. C., Frankel, W., Henderson, N., Hitzemann, R. J., Maxson, S. C., Miner, L. L., Silva, A. J., Wehner, J. M., Wynshaw-Boris, A. und Paylor, R. (1997). "Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies." *Psychopharmacology (Berl)* **132**(2): 107-24.
- DiFrancesco, D., Ferroni, A., Mazzanti, M. und Tromba, C. (1986). "Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node." *J Physiol* **377**: 61-88.
- DiFrancesco, D. und Mangoni, M. (1994). "Modulation of single hyperpolarization-activated channels (i(f)) by cAMP in the rabbit sino-atrial node." *J Physiol* **474**(3): 473-82.
- DiFrancesco, D. und Tortora, P. (1991). "Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP." *Nature* **351**(6322): 145-7.
- Fain, G. L., Quandt, F. N., Bastian, B. L. und Gerschenfeld, H. M. (1978). "Contribution of a caesium-sensitive conductance increase to the rod photoresponse." *Nature* **272**(5652): 466-9.
- Gauss, R., Seifert, R. und Kaupp, U. B. (1998). "Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm." *Nature* **393**(6685): 583-7.
- Gloss, B., Trost, S., Bluhm, W., Swanson, E., Clark, R., Winkfein, R., Janzen, K., Giles, W., Chassande, O., Samarut, J. und Dillmann, W. (2001). "Cardiac ion channel expression and contractile function in mice with deletion of thyroid hormone receptor alpha or beta." *Endocrinology* **142**(2): 544-50.
- Gu, H., Zou, Y. R. und Rajewsky, K. (1993). "Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting." *Cell* **73**(6): 1155-64.
- Hescheler, J., Fleischmann, B. K., Lentini, S., Maltsev, V. A., Rohwedel, J., Wobus, A. M. und Addicks, K. (1997). "Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis." *Cardiovasc Res* **36**(2): 149-62.

- Ishii, T. M., Takano, M., Xie, L. H., Noma, A. und Ohmori, H. (1999). "Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node." *J Biol Chem* **274**(18): 12835-9.
- Jaenisch, R. (1988). "Transgenic animals." *Science* **240**(4858): 1468-74.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T. und MacKinnon, R. (2003). "X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel." *Nature* **423**(6935): 33-41.
- Krieger, J., Strobel, J., Vogl, A., Hanke, W. und Breer, H. (1999). "Identification of a cyclic nucleotide- and voltage-activated ion channel from insect antennae." *Insect Biochem Mol Biol* **29**(3): 255-67.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-5.
- Ludwig, A., Budde, T., Stieber, J., Moosmang, S., Wahl, C., Holthoff, K., Langebartels, A., Wotjak, C., Munsch, T., Zong, X., Feil, S., Feil, R., Lancel, M., Chien, K. R., Konnerth, A., Pape, H. C., Biel, M. und Hofmann, F. (2003). "Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2." *Embo J* **22**(2): 216-24.
- Ludwig, A., Zong, X., Hofmann, F. und Biel, M. (1999). "Structure and function of cardiac pacemaker channels." *Cell Physiol Biochem* **9**(4-5): 179-86.
- Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F. und Biel, M. (1998). "A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels." *Nature* **393**(6685): 587-91.
- Ludwig, A., Zong, X., Stieber, J., Hullin, R., Hofmann, F. und Biel, M. (1999). "Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics." *Embo J* **18**(9): 2323-9.
- Lynch, J. W. und Barry, P. H. (1991). "Inward rectification in rat olfactory receptor neurons." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **243**(1307): 149-53.
- Magee, J. C. (1998). "Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons." *J Neurosci* **18**(19): 7613-24.
- Magee, J. C. (1999). "Dendritic Ih normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons." *Nat Neurosci* **2**(6): 508-14.
- Männikkö, R., Elinder, F. und Larsson, H. P. (2002). "Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages." *Nature* **419**(6909): 837-41.
- Markel, P., Shu, P., Ebeling, C., Carlson, G. A., Nagle, D. L., Smutko, J. S. und Moore, K. J. (1997). "Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains." *Nat Genet* **17**(3): 280-4.
- McCormick, D. A. und Bal, T. (1997). "Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms." *Annu Rev Neurosci* **20**: 185-215.

- McCormick, D. A. und Pape, H. C. (1990). "Noradrenergic and serotonergic modulation of a hyperpolarization-activated cation current in thalamic relay neurones." *J Physiol* **431**: 319-42.
- Moosmang, S., Biel, M., Hofmann, F. und Ludwig, A. (1999). "Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain." *Biol Chem* **380**(7-8): 975-80.
- Moosmang, S., Stieber, J., Zong, X., Biel, M., Hofmann, F. und Ludwig, A. (2001). "Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues." *Eur J Biochem* **268**(6): 1646-52.
- Morris, R. (1984). "Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat." *J Neurosci Methods* **11**(1): 47-60.
- Much, B., Wahl-Schott, C., Zong, X., Schneider, A., Baumann, L., Moosmang, S., Ludwig, A. und Biel, M. (2003). "Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels." *J Biol Chem* **278**(44): 43781-6.
- Müller, F., Scholten, A., Ivanova, E., Haverkamp, S., Kremmer, E. und Kaupp, U. B. (2003). "HCN channels are expressed differentially in retinal bipolar cells and concentrated at synaptic terminals." *Eur J Neurosci* **17**(10): 2084-96.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. und Roder, J. C. (1993). "Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18): 8424-8.
- Nolan, M. F., Malleret, G., Lee, K. H., Gibbs, E., Dudman, J. T., Santoro, B., Yin, D., Thompson, R. F., Siegelbaum, S. A., Kandel, E. R. und Morozov, A. (2003). "The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar Purkinje cells." *Cell* **115**(5): 551-64.
- Noma, A., Yanagihara, K. und Irisawa, H. (1977). "Inward current of the rabbit sinoatrial node cell." *Pflugers Arch* **372**(1): 43-51.
- Notomi, T. und Shigemoto, R. (2004). "Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain." *J Comp Neurol* **471**(3): 241-76.
- Pachucki, J., Burmeister, L. A. und Larsen, P. R. (1999). "Thyroid hormone regulates hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel (HCN2) mRNA in the rat heart." *Circ Res* **85**(6): 498-503.
- Pape, H. C. (1996). "Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons." *Annu Rev Physiol* **58**: 299-327.
- Prut, L. und Belzung, C. (2003). "The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review." *Eur J Pharmacol* **463**(1-3): 3-33.
- Rajewsky, K., Gu, H., Kuhn, R., Betz, U. A., Muller, W., Roes, J. und Schwenk, F. (1996). "Conditional gene targeting." *J Clin Invest* **98**(3): 600-3.

- Redish, A. D. und Touretzky, D. S. (1998). "The role of the hippocampus in solving the Morris water maze." *Neural Comput* **10**(1): 73-111.
- Robinson, R. B. und Siegelbaum, S. A. (2003). "Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function." *Annu Rev Physiol* **65**: 453-80.
- Rudolph, U., Crestani, F., Benke, D., Brunig, I., Benson, J. A., Fritschy, J. M., Martin, J. R., Bluethmann, H. und Mohler, H. (1999). "Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes." *Nature* **401**(6755): 796-800.
- Sambrook, J. R. D. (2001). *Molecular Cloning. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-7.
- Santoro, B., Chen, S., Luthi, A., Pavlidis, P., Shumyatsky, G. P., Tibbs, G. R. und Siegelbaum, S. A. (2000). "Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS." *J Neurosci* **20**(14): 5264-75.
- Santoro, B., Grant, S. G., Bartsch, D. und Kandel, E. R. (1997). "Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(26): 14815-20.
- Sartiani, L., Bochet, P., Cerbai, E., Mugelli, A. und Fischmeister, R. (2002). "Functional expression of the hyperpolarization-activated, non-selective cation current I(f) in immortalized HL-1 cardiomyocytes." *J Physiol* **545**(Pt 1): 81-92.
- Schulze-Bahr, E., Neu, A., Friederich, P., Kaupp, U. B., Breithardt, G., Pongs, O. und Isbrandt, D. (2003). "Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease." *J Clin Invest* **111**(10): 1537-45.
- Spehr, M., Wetzel, C. H., Hatt, H. und Ache, B. W. (2002). "3-phosphoinositides modulate cyclic nucleotide signaling in olfactory receptor neurons." *Neuron* **33**(5): 731-9.
- Stieber, J., Herrmann, S., Feil, S., Loster, J., Feil, R., Biel, M., Hofmann, F. und Ludwig, A. (2003). "The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(25): 15235-40.
- Stieber, J., Hofmann, F. und Ludwig, A. (2004). "Pacemaker channels and sinus node arrhythmia." *Trends Cardiovasc Med* **14**(1): 23-8.
- Ueda, K., Nakamura, K., Hayashi, T., Inagaki, N., Takahashi, M., Arimura, T., Morita, H., Higashiuesato, Y., Hirano, Y., Yasunami, M., Takishita, S., Yamashina, A., Ohe, T., Sunamori, M., Hiraoka, M. und Kimura, A. (2004). "Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia." *J Biol Chem* **279**(26): 27194-8.

- Ulens, C. und Tytgat, J. (2001). "Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels." *J Biol Chem* **276**(9): 6069-72.
- Vargas, G. und Lucero, M. T. (1999). "Dopamine modulates inwardly rectifying hyperpolarization-activated current (I_h) in cultured rat olfactory receptor neurons." *J Neurophysiol* **81**(1): 149-58.
- Wainger, B. J., DeGennaro, M., Santoro, B., Siegelbaum, S. A. und Tibbs, G. R. (2001). "Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels." *Nature* **411**(6839): 805-10.
- Xue, T., Marban, E. und Li, R. A. (2002). "Dominant-negative suppression of HCN1- and HCN2-encoded pacemaker currents by an engineered HCN1 construct: insights into structure-function relationships and multimerization." *Circ Res* **90**(12): 1267-73.
- Yu, H., Chang, F. und Cohen, I. S. (1993). "Phosphatase inhibition by calyculin A increases i(f) in canine Purkinje fibers and myocytes." *Pflugers Arch* **422**(6): 614-6.
- Zagotta, W. N., Olivier, N. B., Black, K. D., Young, E. C., Olson, R. und Gouaux, E. (2003). "Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels." *Nature* **425**(6954): 200-5.

8. Lebenslauf

ANGABEN ZUR PERSON

Name	MADER, ROBERT
Heimatadresse	SALEMERSTR. 6, 88697 BERMATINGEN
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum	19.12.1973
Familienstand	ledig

AUSBILDUNG

<ul style="list-style-type: none"> • Datum (von – bis) • Arbeitgeber 	<p>02/2001 – 11/2004 Ludwigs-Maximilians-Universität, München (LMU) Department Pharmazie wissenschaftlicher Mitarbeiter / Doktorand</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Tätigkeitsbereich oder Branche • Beruf oder Funktion 	
<ul style="list-style-type: none"> • Datum (von – bis) Arbeitgeber 	<p>09/2000 – 12/2000 University of Otago, Dunedin, Neuseeland Department Pharmazie und Mikrobiologie wissenschaftlicher Mitarbeiter</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Tätigkeitsbereich oder Branche • Beruf oder Funktion 	
<ul style="list-style-type: none"> • Datum (von – bis) • Arbeitgeber 	<p>11/1999 – 05/2000 Hexal AG, Holzkirchen Pharmazeutische Entwicklung Pharmaziepraktikum</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Tätigkeitsbereich oder Branche • Beruf oder Funktion 	
<ul style="list-style-type: none"> • Datum (von – bis) • Arbeitgeber 	<p>05/1999 – 10/1999 Johannes Apotheke, Gröbenzell öffentliche und krankenhausversorgende Apotheke Pharmaziepraktikum</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Tätigkeitsbereich oder Branche • Beruf oder Funktion 	
<ul style="list-style-type: none"> • Datum (von – bis) • Ausbildungseinrichtung 	<p>05/1995 - 06/2000 Ludwigs-Maximilians-Universität, München (LMU), Department Pharmazie Pharmaziestudium Apotheker</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Hauptfächer/berufliche Fähigkeiten • Bezeichnung der erworbenen Qualifikation 	
<ul style="list-style-type: none"> • Datum (von – bis) Arbeitgeber 	<p>10/1993 – 05/1995 Deutsches Rotes Kreuz Bodenseekreis, Markdorf Rettungsdienst / Zivildienst Rettungssanitäter</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Tätigkeitsbereich oder Branche • Beruf oder Funktion 	
<ul style="list-style-type: none"> • Datum • Ausbildungseinrichtung 	<p>05/1993 Gymnasium des Bildungszentrums Markdorf Abitur</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Bezeichnung der erworbenen Qualifikation 	

9. Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Professor Biel für die Überlassung dieses Themas und die hervorragende Betreuung. Hervorheben möchte ich auch die ständige Bereitschaft, eventuell aufgetretene Probleme jederzeit zu diskutieren.

Herrn Professor Pfeifer danke ich für die Übernahme des zweiten Gutachtens und die Betreuung während eines weiteren Projektes, einer Knockin-Mauslinie.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Juliane Stieber für die EKG-Telemetrie, ohne sie hätte die Entdeckung des Phänotyps bedeutend länger gedauert.

Dr. Susanne Feil und PD Dr. Robert Feil gilt mein Dank für die Blastozysteninjektion der Stammzellen und für die herzliche Aufnahme bei jedem meiner Besuche.

PD Dr. Mathias Seeliger danke ich für die Durchführung der ERG-Experimente, Prof. Hatt für die EOG-Versuche.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der Verhaltensversuche möchte ich mich bei Prof. Lipp, PD Dr. David Wolfer und Dr. Hans Welzl bedanken.

Daniela Scholz danke ich für die exzellente Unterstützung und Durchführung des HCN4-Knockin Projekts und natürlich für die sehr angenehme und lustige Zeit in unserer Laborecke.

Bei Angelika Mader, Christian Wahl-Schott, Stylianos Michalakis, Sabine Hüttl, Heidi Geiger, Ilka und René Noppel bedanke ich mich für die Durchsicht meiner Arbeit.

Für den meist sehr angenehmen und häufig lustigen Laboralltag sind sämtliche Mitglieder unseres Arbeitskreises verantwortlich. Dafür meinen herzlichen Dank. In ganz besonderer Weise gilt dies für Christian und Roti. An dieser Stelle möchte ich in Bezug auf einige gemütliche Feierabendrunden auch Pernod für ihren hervorragenden Pastis und der badischen Staatsbrauerei Rothaus für das unerreichte Tannenzäpfle danken (nicht zu vergessen unsere Importeurin Daniela).

Stelio und Pine, wer hätte 1995 zu Beginn unseres Studiums gedacht, dass wir mal gemeinsam promovieren werden. Die gemeinsam erlebte Zeit bedeutet mir sehr viel!

Mein Dank gilt sämtlichen Mitgliedern des PDM, besonders HP, Matthias und Roti, für unvergessliche und lustige Aktionen.

Ilka, Dir danke ich für die unglaublich große Geduld, die Du mit mir bewiesen hast, nachdem es doch ein wenig länger gedauert hat.